



Diversité chimique et potentiel antimicrobien d'huiles essentielles de plantes libanaises

Layal Fahed

► To cite this version:

Layal Fahed. Diversité chimique et potentiel antimicrobien d'huiles essentielles de plantes libanaises. Médecine humaine et pathologie. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2016. Français. NNT : 2016MNHN0005 . tel-01873133

HAL Id: tel-01873133

<https://theses.hal.science/tel-01873133>

Submitted on 13 Sep 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MUSEUM NATIONAL



D'HISTOIRE NATURELLE

Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

Année 2016

N°attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Présentée et soutenue publiquement par

Layal FAHED

Le 12 septembre 2016

**Diversité chimique et potentiel antimicrobien d'huiles
essentielles de plantes libanaises**

Sous la direction de : Monsieur Didier STIEN, Chargé de recherche

Monsieur Marc El BEYROUTHY, Professeur associé

JURY :

M. Champy, Pierre	Professeur, Laboratoire de Pharmacognosie, CNRS UMR 8076 BioCIS, 92296 Châtenay-Malabry, France	Président du jury
M. El Beyrouthy, Marc	Professeur associé, Université Saint-Esprit de Kaslik, Kaslik, Liban	Co-directeur de Thèse
M. Leonti, Marco	Professeur, Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, 09124 Cagliari, Italy.	Rapporteur
M. Ouaini, Naïm	Professeur, Université Saint-Esprit de Kaslik, Kaslik, Liban	Examineur
M. Stien, Didier	Chargé de recherche, UPMC-CNRS, 66650 Banyuls-sur-mer, France	Directeur de Thèse
Mme Tomasi, Sophie	Professeur, UMR CNRS 6226, Univ. Rennes 1, Université Européenne de Bretagne, F-35043 Rennes, France	Rapporteur

*Il n'est rien d'essentiel à l'homme qui ne soit figuré naturellement, dans le caillou, la plante
ou la bête*

André Pieyre de Mandiargues

*La plupart des hommes ont, comme les plantes, des propriétés cachées que le hasard fait
découvrir*

Francois de la Rochefoucauld

Il faut accepter de planter pour que d'autres récoltent ailleurs et plus tard

Bernard Werber

Perseverance is failing 19 times and succeeding the 20th

Julie Andrews Edwards

*Tout ce que vous voulez que les hommes fassent pour vous, faites-le de même pour eux :
c'est la loi et les prophètes*

Matthieu 7:12

Remerciements

Je tiens d'abord à exprimer ma gratitude envers mes directeurs de thèse, Dr. Didier Stien et Dr. Marc El Beyrouthy. Didier, pour l'engagement, la patience et la bonté exceptionnels dont tu as fait preuve, je te remercie. Je suis assez chanceuse d'avoir été formée par un encadrant si professionnel et si expert dans son domaine. Ta vision globale et tes idées constructives m'ont tout à fait aidé à m'épanouir au niveau de la recherche. À Dr. Marc, mon encadrant depuis le master, toute ma reconnaissance pour avoir cru en moi et pour m'avoir donné cette opportunité. Merci d'avoir toujours trouvé le temps pour m'écouter et me diriger malgré un calendrier si chargé. Merci également d'avoir partagé avec moi ta passion pour le règne végétal et tes connaissances précieuses.

J'aimerais de même exprimer mes plus vifs remerciements à Pr. Naïm Ouaini pour ses efforts pertinents déployés continuellement pour que cette thèse soit réalisée et accomplie dans les meilleures conditions.

Je remercie également Dr. Véronique Eparvier pour m'avoir accueillie à l'ICSN au sein de l'équipe Substances Naturelles et Biodiversité. Tu m'as permis de profiter de tes expertises et tu n'as jamais hésité à m'aider à franchir les obstacles rencontrés.

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté l'examen de mes travaux et dégagé du temps pour s'y consacrer.

Madona, le temps passé ensemble, au laboratoire ainsi que dans les rues de Paris (témoins de nos moments sacrés de défoulement), restera à jamais creusé dans ma mémoire. Et bien sûr, merci de m'avoir fait part de ton expérience dans les domaines de microbiologie et des huiles essentielles.

Un grand merci à mes collègues, Amandine, Yannik, Seindé et Caroline pour votre collaboration à tous les niveaux et surtout pour votre amitié.

À ma grand-mère, mes oncles Fady, Antoine et Jean, mes cousins et cousines (surtout Cindy) qui ont compensé l'amertume du mal du pays et qui ont été toujours là pour moi rendant mon séjour à Paris confortable et guai, un immense merci.

Mes chers parents, mes modèles d'ambition et de persévérance, et mes frères, Elie et Ralph, merci pour votre support et votre encouragement continus.

Elio, je ne pourrais jamais assez te remercier pour ton amour, ton écoute, ta compréhension et ta patience. Merci pour avoir essayé d'être impliqué le plus possible dans ce travail bien loin de ton domaine. Merci pour m'avoir accompagnée et soutenue dans mes nombreux moments de faiblesse.

Enfin, j'aimerais remercier le bon Dieu pour ses interventions dans les plus petits détails de ma vie.

Sommaire

Partie 1 : Flore libanaise, médecine traditionnelle et phytothérapie	16
1. Caractéristiques du Liban et de la flore libanaise	17
2. La médecine par les plantes d'hier à aujourd'hui, au Liban et ailleurs.....	20
2.1. Utilisation traditionnelle	20
2.2. Médicaments d'origine végétale.....	22
Partie 2 : Les composés organiques volatils des végétaux.....	26
1. Rôle fonctionnel des composés organiques volatils dans les plantes	27
2. Les huiles essentielles	28
2.1. Aromathérapie dans l'histoire	30
2.2. Composition chimique des huiles essentielles	32
2.2.1. Composés terpéniques	32
2.2.2. Phénylpropanoïdes.....	35
2.3. Domaines d'application des huiles essentielles	36
2.3.1. Application en agronomie	36
2.3.2. Application dans le secteur de l'alimentaire	38
2.3.3. Application en cosmétologie	39
2.3.4. Application dans le secteur de santé	40
2.3.4.1. Généralités.....	40
2.3.4.2. Les huiles essentielles comme antimicrobiens, une utilisation bio-inspirée	41
Partie 3 : Problématique et objectifs de l'étude	44
1. Problématique	45
1.1. Induction et diffusion de la résistance aux antimicrobiens.	45
1.2. Evolution de la résistance aux antimicrobiens.....	46
1.3. Alerte sur la résistance aux antimicrobiens.....	48
2. Objectifs de la thèse.....	49
Partie 4 : Caractéristiques des principaux micro-organismes utilisés dans l'étude	51
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	52
1.1. Pouvoir pathogène	52
1.2. Traitement et résistance.....	53
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
2.1. Pouvoir pathogène	55
2.2. Traitement et résistance.....	57
3. <i>Candida albicans</i>	58
3.1. Pouvoir pathogène	59
3.2. Traitement et résistance.....	60
4. <i>Trichophyton rubrum</i>	61
4.1. Pouvoir pathogène	61
4.2. Traitement et résistance.....	63
Partie 5 : Analyse chimique et mise en évidence des propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles	64
1. Données générales relatives à l'ensemble des huiles essentielles étudiées.....	65
1.1. Matériel végétal	65
1.2. Analyse chimique des huiles essentielles	68
1.2.1. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles par GC/MS.....	68
1.2.2. Confirmation de l'identification des molécules majoritaires par RMN	69
1.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	70
1.4. Classification des huiles essentielles par proximité chimique	71
2. ARTICLE 1 : Diversité chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Salvia multicaulis</i> Vahl.....	74
2.1. Contexte de l'étude.....	75
2.2. Article	77

3.	ARTICLE 2 : Isolation et caractérisation du santolinoïdol, un sesquiterpène bisabolène d' <i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i> (K. Koch) Greuter	90
3.1.	Contexte de l'étude.....	91
3.2.	Graphical abstract.....	93
3.3.	Article.....	94
4.	ARTICLE 3 : L'activité antimicrobienne <i>in vitro</i> de l'huile essentielle d' <i>Hypericum scabrum</i> , d'un mélange reconstitué, et des combinaisons de l'huile avec des médicaments anti-fongiques.....	112
4.1.	Contexte de l'étude.....	113
4.2.	Article.....	115
5.	ARTICLE 4 : La composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de six conifères récoltés au Liban	129
5.1.	Contexte de l'étude.....	130
5.2.	Article.....	131
	Conclusion.....	143
	Perspectives	145
	Partie expérimentale	147
1.	Récolte du matériel végétal et obtention des huiles essentielles.....	148
2.	Analyses chimiques des huiles essentielles.....	148
2.1.	Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (GC) et couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (GC/MS).....	148
2.1.1.	Analyses GC.....	148
2.1.2.	Analyses GC/MS.....	149
2.1.3.	Identification et quantification.....	149
2.2.	Fractionnement et extraction.....	150
2.2.1.	Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	150
2.2.2.	Extraction	151
2.3.	Analyses RMN.....	151
2.4.	Analyses UPLC-ESI-TOFMS.....	151
2.5.	Mesure du pouvoir rotatoire	152
2.6.	Analyse comparative des profils des huiles essentielles obtenus par GC/MS.....	152
2.6.1.	Conversion des données.....	152
2.6.2.	Traitement des données sous XLstat	152
3.	Analyses biologiques des huiles essentielles	152
3.1.	Evaluation de l'activité antimicrobienne	152
3.1.1.	Pathogènes.....	152
3.1.2.	Préparation des inocula de pathogènes.....	153
3.1.3.	Test de Microdilution.....	153
3.1.4.	Test de synergie entre une huile essentielle et un antimicrobien commercial	155
3.2.	Evaluation de la cytotoxicité.....	159
	Annexes.....	160
1.	Annexe 1 : Composition chimique des huiles essentielles qui n'ont pas fait l'objet d'une publication ou d'un projet de publication	161
2.	Annexe 2 : Résultats de l'activité antimicrobienne des HEs lors du second criblage	164
3.	Annexe 3 : Isobogrammes représentant les résultats des tests de synergie des combinaisons des huiles essentielles les plus actives avec des antimicrobiens commerciaux.....	165
4.	Annexe 4 : Quantification des résultats des tests de synergie qui n'ont pas fait l'objet d'une publication ou d'un projet de publication	171
5.	Annexe 5 : Résultats des tests de cytotoxicité	173

Liste des abréviations / Abbreviation list

av. J.-C. :	Avant Jésus-Christ
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ATCC :	American Type Culture Collection
ATP :	Adénosine TriPhosphate
ap. J.-C. :	Après Jésus-Christ
CAH :	Classification Ascendante Hiérarchique
CDC :	United States Centers for Disease Control and prevention
CI ₅₀ :	Concentration Inhibitrice de la croissance de 50 % de la croissance cellulaire
CIF (FIC) :	Concentrations Inhibitrices Fractionnaires (Fractional Inhibitory Concentrations)
CIP :	Collection de l'Institut Pasteur
CLHP (HPLC) :	Chromatographie Liquide Haute Performance (High-Performance Liquid Chromatography)
CLSI :	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI (MIC) :	Concentration Minimale Inhibitrice (Minimal Inhibitory Concentration)
COSY :	Correlation Spectroscopy
COV :	Composé Organique Volatil
DEDL :	Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière
DMAPP :	DiMéthylAllyl-Pyrophosphate
DMSO :	DiMéthylSulfOxyde
DXP :	DéoxyXylulose Phosphate
HRESITOFMS :	High Resolution ElectroSpray Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry
FID :	Flame Ionization Detector
FPP :	FarnésylPyroPhosphate
FDA :	Food and Drug Administration
GC/MS :	Gaz Chromatography / Mass Spectrometry (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie demasse)
GPP :	GéranylPyroPhosphate
HE (EO) :	Huile Essentielle (Essential Oil)
HMBC :	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC :	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ICIF (FICI) :	Indice de CIF (FIC Index)
IK (KI) :	Indice de Kovats (Kovats index)
IPP :	Isopentényl-Pyrophosphate
IR/RI :	Indice de rétention (Retention index)
IS :	Indice de Sélectivité
J :	Constante de couplage
MEP :	MéthylErythritol Phosphate
M-H :	Mueller-Hinton

MOPS :	Acide 3-(N-MOrpholino)-PropaneSulfonique
MRC5 :	Lignée cellulaire saine de fibroblastes de poumons foetaux humains
MVA :	MéValonatE
NIST :	National Institute of Standards and Technology
NDM :	New Delhi Métallo-bêta-lactamase
NOESY :	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OMS (WHO) :	Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization)
PAL/TAL :	Phénylalanine/Tyrosine Ammonia-Lyase
pH :	Potentiel Hydrogène
ppm :	Parties Par Millions
REACH :	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RMN (NMR) :	Résonnance Magnétique Nucléaire (Nuclear Magnetic Resonance)
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute Medium
SAIV :	S. Aureus à Sensibilité Intermédiaire à la Vancomycine
SARM :	S. Aureus Résistants à la Meticilline
SARV :	S. Aureus Résistantes à la Vancomycine
SIDA :	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
TMS :	TetraMéthylSilane
UFC :	Unité Formant Colonie
Uma (Amu) :	Unité de Masse Atomique (Atomic Mass Unit)
UPLC :	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV :	Ultra-Violet
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Liste des figures

Figure 1 : Principales unités de relief du Liban (CNRS/DAR/IAURIF)	17
Figure 2 : Exemple d'espèces endémiques du Liban.....	18
Figure 3 : Cèdre du Liban (https://www.flickr.com/)	19
Figure 4 : La morphine	23
Figure 5 : Sève rouge du <i>Croton lechleri</i> (http://www.arteyfotografia.com/).....	25
Figure 6 : hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger	29
Figure 7 : Isoprène.....	32
Figure 8 : Les structures de quelques mono- et sesquiterpènes	33
Figure 9 : Différentes voies de biosynthèse des terpènes.....	34
Figure 10 : Monoterpènes et sesquiterpènes à partir de l'IPP et le DMAPP	35
Figure 11 : Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.....	36
Figure 12 : Structure de quelques phénylpropanoïdes.....	36
Figure 13 : Furoncle causé par une infection à <i>S. aureus</i> (http://lifeinthefastlane.com/)..	52
Figure 14 : Syndrome des ongles verts causé par une infection à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
Figure 15 : Muguet du nourrisson (https://www.flickr.com/)	60
Figure 16 : Tinea pedis ou pied d'athlète (https://www.flickr.com/)	62
Figure 17 : Proportion relative des espèces contenant chacun des COVs retrouvés dans les 20 huiles essentielles	69
Figure 18 : <i>Salvia multicaulis</i> Vahl	76
Figure 19 : <i>Achillea santolinoides</i> subsp. <i>wilhelmsii</i> (K. Koch) Greuter	92
Figure 20 : <i>Hypericum scabrum</i> L.....	114
Figure 21 : Plan de plaque 96 puits utilisé pour le test de microdilution des huiles essentielles	154
Figure 22 : Schéma de plaque d'interaction entre huile essentielle et antibiotique / antifongique.....	156

Figure 23 : Représentation graphique et interprétation d'un isobologramme	158
---	-----

Figures relatives aux articles :

Article 1 : Diversité chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Salvia multicaulis* Vahl

Figure 1: Degree of dissimilarity of the chemical compositions of seventeen <i>S. multicaulis</i> EOs (Table 2, Entries 1–17). The dendrogram was obtained by agglomerative hierarchical clustering based on Euclidian distances with Ward's aggregation method. For the composition, country of origin and literature source of each EO, cf. Table 2	83
---	----

Article 2 : Isolation et caractérisation du santolinoïdol, un sesquiterpène bisabolène d'*Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter

Figure 1: Santolinoidol (1) from <i>A. santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i>	98
--	----

Figure 2: Fig. 2. Selected NOESY correlations in 1	98
--	----

Figure S1: ¹ H NMR spectrum (600 MHz).....	105
---	-----

Figure S2: ¹³ C NMR spectrum (150.9 MHz)	106
---	-----

Figure S3 : COSY spectrum	107
---------------------------------	-----

Figure S4 : HSQC spectrum.....	108
--------------------------------	-----

Figure S5 : HMBC spectrum.....	109
--------------------------------	-----

Figure S6 : NOESY spectrum.....	110
---------------------------------	-----

Article 4 : La composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de six conifères récoltés au Liban

Figure 1: Biplot from the principal component analysis of the six conifers EOs	136
--	-----

Liste des tableaux

Tableau 1 : Informations relatives à l'origine des HEs étudiées	66
Tableau 2 : Dendrogramme représentant le degré de similarité des HEs, associé aux activités antimicrobiennes et composés majoritaires correspondants	72
Tableau 3 : Identification des souches pathogènes utilisées	153
Tableaux relatifs aux articles	
Article 1 : Diversité chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Salvia multicaulis</i> Vahl	
Table 1: Chemical composition of <i>Salvia multicaulis</i> essential oils	80
Table 2: Literature survey of the chemical diversity and chemotypes of <i>S. multicaulis</i> essential oils.....	82
Table 3: Antimicrobial activity (MIC in µg/ml) of <i>S. multicaulis</i> essential oils and nerolidol	84
Article 2 : Isolation et caractérisation du santolinoïdol, un sesquiterpène bisabolène d' <i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i> (K. Koch) Greuter	
Table 1: Partial chemical composition of <i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i> essential oil, including compounds accounting for more than 6% of the oil ^a	97
Table 2: Spectral data for santolinoidol (1) in CDCl ₃	99
Table 3: Antimicrobial activity (MIC in µg/ml) of <i>A. santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i> EO	99
Table S1: Chemical Composition of <i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i> essential oil	104
Article 3 : L'activité antimicrobienne in vitro de l'huile essentielle d' <i>Hypericum scabrum</i> , d'un mélange reconstitué, et des combinaisons de l'huile avec des médicaments antifongiques	
Table 1: Chemical Composition of <i>Hypericum scabrum</i> essential oil	119
Table 2: Antimicrobial activity (MIC in µg/ml) of <i>Hypericum. scabrum</i> EO.....	120
Table 3: Antifungal activity (MIC in µg/ml) of the major constituents of <i>Hypericum scabrum</i> EO and a reconstructed EO from the major constituents on <i>Trichophyton rubrum</i>	120
Table 4: Combined effects of <i>Hypericum scabrum</i> essential oil and conventional antimicrobial drugs on <i>Trichophyton rubrum</i>	121

Article 4 : La composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de six conifères récoltés au Liban

Table 1: Chemical composition of six conifers essential oils..... 134

Table 2: Antimicrobial activity (MIC in µg/ml) of the six conifers essential oils 137

Table 3: Antimicrobial activity (MIC in µg/ml) of *C. macrocarpa* major compounds and a reconstructed essential oil prepared with the combination of these compounds..... 138

Partie 1 : Flore libanaise, médecine traditionnelle et phytothérapie

1. Caractéristiques du Liban et de la flore libanaise

Le Liban est un pays du Proche-Orient bordé au nord et à l'est par la Syrie, au sud par la Palestine et à l'ouest par les rives orientales de la mer Méditerranée. Il se trouve ainsi à la charnière de trois continents, l'Asie, l'Europe et l'Afrique.

Sa superficie est de 10452 km² et environ les trois quarts de sa surface totale est montagneuse.¹ Deux chaînes de montagnes parallèles au littoral, le Mont-Liban et l'Anti-Liban, sont étendues sur la longueur du pays et séparées par une plaine, la vallée de Bekaa (Figure 1).

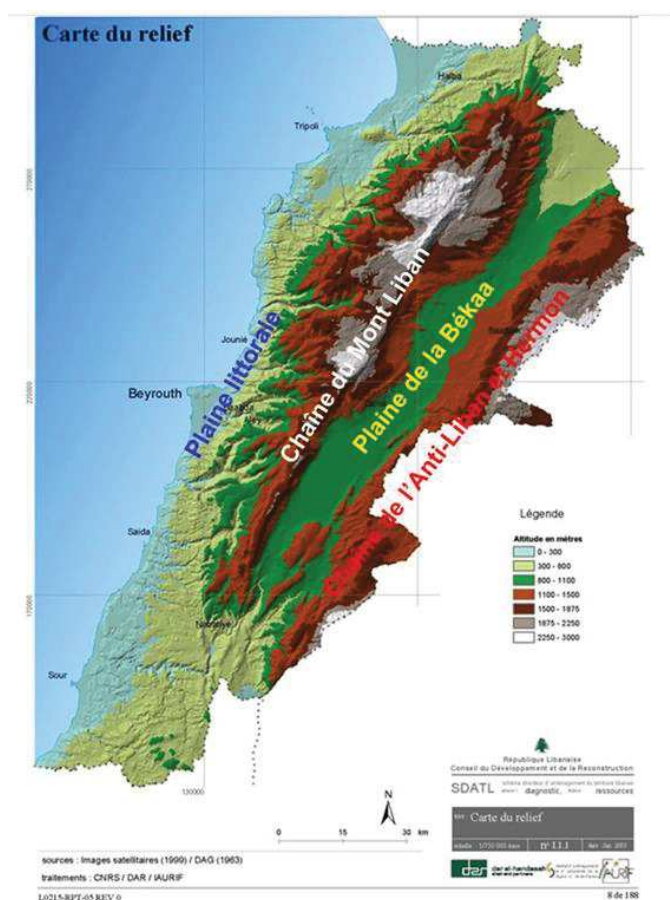


Figure 1 : Principales unités de relief du Liban (CNRS/DAR/IAURIF)

¹ ECODIT/ MOE/LEDO, 2001. Lebanon State of the Environment Report.

<http://www.moe.gov.lb/getattachment/The-Ministry/Reports/State-Of-the-Environment-Report-2001/Chap-10-Biodiversity.pdf.aspx>

Dix pour cent des plantes supérieures de la planète se trouvent dans la zone du bassin méditerranéen qui ne représente que 1,6 % de la surface de la Terre.² Dans cette zone, 10 hotspots de biodiversité végétale ont été identifiés. Le domaine Syrie-Liban-Israël est l'un d'eux.² En général, les hotspots de biodiversité sont définis en se basant sur la richesse en espèces, le danger d'extinction et le taux d'endémisme qui reflètent la complexité et le caractère unique des écosystèmes.^{3,4}

En dépit de sa superficie relativement réduite, le Liban compterait 2612 espèces différentes de plantes vasculaires (plantes à fleurs et fougères) se distribuant dans 757 genres et 124 familles. Parmi ces plantes 108 sont endémiques strictes du Liban (Figure 2), 154 sont endémiques du Liban et de la Syrie, 104 sont endémiques du Liban de la Syrie et de la Turquie, 59 sont endémiques du Liban de la Syrie et de la Palestine, 29 sont endémiques du Liban et de la Turquie et 21 sont endémiques du Liban et de la Palestine.⁵



Iris sofarana

Viola libanotica

Figure 2 : Exemple d'espèces endémiques du Liban

² Médail, F., Quézel, P., 1999. Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Basin: Setting Global Conservation Priorities. Conservation Biology 13, 1510–1513.

³ Myers, N., 1988. Threatened biotas: “hot-spots” in tropical forests. The Environmentalist 8, 187–208.

⁴ Caldecott, J.O., Jenkins, M.D., Johnson, T.H., Groombridge, B., 1996. Priorities for conserving global species richness and endemism. Biodiversity and Conservation 5, 699–727.

⁵ Mouterde, P., 1966, 1970, 1983. Nouvelle flore du Liban et de la Syrie, Tome I, II, III. Dar El Mashreq, Liban.

Cette richesse exceptionnelle et ce taux d'endémisme élevé sont surtout liés à la singularité et la diversité géomorphologique du pays (5 régions différentes) qui ont donné lieu à au moins 22 zones bioclimatiques et habitats différents favorisant le développement d'une flore très diversifiée.¹

Un aperçu de la variété des environnements naturels du Liban nous est offert par François Couplan, ethnobotaniste spécialiste des plantes sauvages : « Le littoral et la partie basse des montagnes appartiennent à la zone méditerranéenne la plus chaude, où poussent le caroubier, le pistachier et le myrte. Plus haut s'étagent les pins, les chênes à feuilles persistantes, puis leurs cousins à feuilles caduques, accompagnés d'un cortège varié d'arbustes, d'arbrisseaux et de plantes herbacées. Les célèbres cèdres du Liban (Figure 3) ne se rencontrent qu'à partir d'une altitude de 1400 m dans quelques zones bien délimitées. Avec eux, et plus haut encore, croissent une multitude de végétaux adaptés aux conditions extrêmes de ces milieux, glacés en hiver et terriblement arides en été. Le nord-est de la Bekaa, qui ne reçoit que 200 mm d'eau par an, contre plus d'un mètre sur le versant occidental des montagnes, est couvert d'une végétation steppique, prémices des « déserts » syriens ». ⁶



Figure 3 : Cèdre du Liban (<https://www.flickr.com/>)

⁶ Couplan, F. Plantes sauvages comestibles et médicinales.
http://www.couplan.com/fr/projets/liban_nature.php

2. La médecine par les plantes d'hier à aujourd'hui, au Liban et ailleurs

2.1. Utilisation traditionnelle

L'homme se sert des vertus thérapeutiques des plantes pour son bien-être depuis la nuit des temps. Au fil des siècles, et de façon empirique, il a progressivement sélectionné celles qui lui sont bénéfiques accumulant ainsi des connaissances précieuses qu'il a transmises oralement d'une génération à une autre. Ces savoirs ancestraux, ont été ensuite organisés et représentés dans des écrits qu'on nomme pharmacopées.

C'est aux civilisations du Proche-Orient antique qu'on doit les documents les plus anciens rapportant les bienfaits curatifs de centaines de plantes.⁷ Sur des tablettes sumériennes de Nippur a été gravée, en écriture cunéiforme, durant le troisième millénaire avant notre ère, la liste des drogues utilisées à cette époque dans laquelle figure l'opium du pavot somnifère.⁸ Le papyrus d'Ebers où est décrit l'emploi de nombreuses drogues végétales, a été rédigé, en écriture hiéroglyphique, au 16^{ème} siècle avant notre ère. C'est le texte médical le plus complet de l'Égypte antique.⁹

Dans un pays méditerranéen voisin, la Grèce, et plus près de notre époque, virent le jour les célèbres « *Corpus Hippocraticum* » écrit par les disciples d'Hippocrate après sa mort vers l'an 377 av. J.-C. et « *De Materia Medica* » écrit au premier siècle ap. J.-C. par Dioscoride. Ces deux textes sont consacrés en grande partie aux plantes médicinales.^{10,11} Galien, un

⁷ Mazars, G., 2002. Pharmacopées du Proche-Orient Antique, dans : Fleurentin J., Pelt J.-M., Mazars G. (éds), Des sources du savoir aux médicaments du futur. IRD, Paris.

⁸ Clément, R.P., 2005. Aux racines de la phytothérapie : entre tradition et modernité (1^{ère} partie). Phytothérapie 4, 171–175.

⁹ Vinel, A., Pialoux, J., 2005. Ancient Egyptian Medicine and Traditional Chinese Medicine. Congrès R.E.F.S. (Registre Européen et Français de Sinergétique), Aix-en-Provence.

¹⁰ Pikoulis, E., Msaouel, P., Avgerinos, E.D., Anagnostopoulou, S., Tsigris, C., 2008. Evolution of medical education in ancient Greece. Chinese Medical Journal 121, 2202–2206.

¹¹ Quetin-Leclercq, J., 2002. Le voyage insolite de la plante au médicament. Journal de Pharmacie de Belgique 57, 11-20.

autre médecin grec né vers l'année 129 ap. J.-C. a laissé de précieux traités qui ont pesé pendant plus de quatorze siècles sur la médecine.¹² Entre autres, des remèdes d'origine végétale y sont décrits.

Pendant le Moyen-âge, des grands savants du monde arabe et islamique (se propageant durant cette période en Afrique du Nord, Espagne, partie de l'Asie centrale jusqu'au fleuve Indus) tels que Hunain ibn Ishaq, Razès et Avicenne ont synthétisé et assimilé la somme des traditions thérapeutiques grecs. Cela a été possible par la traduction des anciens manuscrits notamment ceux d'Hippocrate et Galien auxquels ils ont ajouté leur propre expérience.¹³

Malgré un contexte régional historiquement riche, il est surprenant de constater qu'encore aujourd'hui, le Liban ne possède pas sa propre pharmacopée. Cependant, la pratique de la médecine traditionnelle y est largement répandue pour les soins primaires, surtout dans les communautés rurales.^{14,15} Cinq cent vingt-neuf espèces végétales y sont utilisées à des fins thérapeutiques.¹⁶ En plus des plantes indigènes, certaines importées surtout d'Inde, d'Iran et des pays arabes ont fusionné dans la culture libanaise et constituent une partie intégrante des plantes utilisées en phytothérapie. Ce type de pratique est toujours aussi populaire pour plusieurs raisons dont le coût élevé des médicaments conventionnels, la facilité de se procurer des plantes médicinales et surtout la perception erronée de leur sécurité absolue.

¹² Serageldin, I., 2013. Ancient Alexandria and the dawn of medical science. *Global Cardiology Science & Practice* 4, 395–404.

¹³ Falagas, M.E., Zarkadoulia, E.A., Samonis, G., 2006. Arab science in the golden age (750–1258 C.E.) and today. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 20, 1581–1586.

¹⁴ El-Beyrouthy, M., Arnold Apostolides, N., 2003. Contribution à l'étude de quelques familles médicinales de la flore libanaise. *Annales de Recherche Scientifique* 4, 47–59.

¹⁵ Baydoun, S., Chalak, L., Dalleh, H., Arnold, N., 2015. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in traditional medicine by the communities of Mount Hermon, Lebanon. *Journal of Ethnopharmacology* 173, 139–156.

¹⁶ El-Beyrouthy, M., 2009. Contribution à l'ethnopharmacologie libanaise et aux Lamiaceae du Liban. *Acta Botanica Gallica*. 156, 515–521.

Le Liban n'est pas une exception, en fait, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'actuellement, la médecine traditionnelle est la principale, voire l'unique source de soins de santé pour 80 % de la population des pays en développement.¹⁷

2.2. Médicaments d'origine végétale

Une récente évaluation révèle que les produits naturels et leurs dérivés représentent plus d'un tiers de toutes les nouvelles entités moléculaires approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA). Environ la moitié d'entre eux proviennent de mammifères, un quart des microbes et un quart de plantes.¹⁸

Pour ne considérer que les plantes, il convient de rappeler que plusieurs milliers d'entités chimiques différentes peuvent être bio-synthétisées par une plante. Leurs métabolites secondaires sont extrêmement diversifiés. Plus que de 200 000 structures différentes ont été décrites.¹⁹ Ces molécules peuvent avoir des rôles fonctionnels importants, étant impliquées notamment dans la communication interspécifique ou dans les mécanismes de survie des plantes dans un environnement essentiellement hostile pour elles.¹⁹

La phytochimie a permis de découvrir d'innombrables molécules thérapeutiques qui ont joué et jouent encore un rôle de premier plan dans le développement de médicaments conventionnels. Certaines molécules les plus anciennes occupent toujours une place indéniable dans le système médical actuel. A titre d'exemple, la morphine (Figure 4), un alcaloïde qui a été isolé pour la première fois en 1804 de l'opium du pavot, *Papaver somniferum*, reste encore aujourd'hui un des antalgiques de référence.²⁰ La codéine isolée

¹⁷ Organisation Mondiale de la Santé. Message du Directeur régional de l'OMS pour l'Afrique, Dr Luis Gomes Sambo, à l'occasion de la Journée africaine de la médecine traditionnelle de 2013. <http://www.afro.who.int/fr/rdo/allocutions/3870-message-du-directeur-regional-de-loms-pour-lafrique-dr-luis-gomes-sambo-a-loccasion-de-la-journee-africaine-de-la-medecine-traditionnelle-de-2013.html>

¹⁸ Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M.S., Hoyer, D., 2016. An analysis of FDA approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today* 21, 204–207.

¹⁹ Hartmann, T., 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68, 2831–2846.

²⁰ Belon, J.P., Faure, S., Pillon, F., 2013. Pathologies et thérapeutiques commentées : Enseignements spécifiques, intégrés et formation d'application. Elsevier Masson, Paris.

de la même plante quelques années plus tard, en 1832, est l'opiacé naturel le plus utilisé dans le monde.²¹ L'atropine, anticholinergique isolée en 1833 de la belladone *Atropa belladonna* et la digoxine, un glycoside cardiotonique isolé en 1930 de la digitale laineuse *Digitalis lanata*, sont parmi les médicaments récemment décrits comme essentiels par l'OMS.²² Le premier anticancéreux naturel, la vinblastine, un vinca-alcaloïde initialement isolé de la pervenche de Madagascar, *Catharanthus roseus*, en 1958 est actuellement toujours utilisé en chimiothérapie.^{23,24}

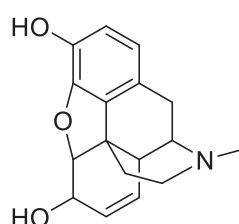


Figure 4 : La morphine

A l'exception de l'*Atropa belladonna* et la *Digitalis lanata* qui étaient reconnues comme toxiques, les plantes citées ci-dessus étaient traditionnellement utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques bien avant l'isolement et l'identification de leurs substances actives. Egalement, une étude faite sur 119 médicaments dérivants des plantes a montré que les indications thérapeutiques de 74 % d'entre eux sont identiques ou liées à l'utilisation ethnomédicale de leurs plantes sources.²⁵ Cela souligne la pertinence de l'information ethnopharmacologique pour la recherche de nouveaux médicaments.

²¹ Nations Unies, 2000. Rapport de l'Organe international de contrôle des stupéfiants pour 1999. https://www.incb.org/documents/Publications/AnnualReports/AR1999/AR_1999_F.pdf

²² Organisation Mondiale de la Santé, 2015. 19th WHO Model List of Essential Medicines. http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015_8-May-15.pdf

²³ Bhattarai, A., 2010. Protection of Himalayan Biodiversity: International Environmental Law and a Regional Legal Framework. Sage Publications, India.

²⁴ Zulkipli, I., David, S., Rajabalaya, R., Idris, A., 2015. Medicinal Plants: A Potential Source of Compounds for Targeting Cell Division. Drug Target Insights 9, 9–19.

²⁵ Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D.D., Guo, Z., 1985. Medicinal plants in therapy. Bulletin of the World Health Organization 63, 965–981.

En outre, malgré tous les défis que représente leur mise sur le marché, l'intérêt pour le développement de produits végétaux complexes à des fins thérapeutiques ne cesse d'augmenter et en octobre 2006, la FDA a approuvé la commercialisation du premier produit botanique, un extrait normalisé de feuilles de thé vert de Chine (*Camellia sinensis*) en tant que médicament sur ordonnance pour le traitement topique des verrues génitales et périanales externes, sous le nom de Veregen.²⁶ L'autorisation initiale de mise sur le marché de Veregen a été octroyée en août 2009 en Allemagne, en février 2010 en Autriche et en février 2011 en Espagne. Depuis mars 2012, 17 pays européens, dont la France, ont octroyé une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) à ce médicament.²⁷

Un second produit botanique et le premier de ce type à être administré oralement a été approuvé par la FDA en fin de l'année 2012.²⁸ C'est le crofelemer indiqué pour le traitement de la diarrhée chez les patients positifs au VIH. Il dérive de la sève rouge de l'arbre de l'Amérique du Sud *Croton lechleri* communément appelé sang du dragon (Figure 5).

²⁶ Chen, S.T., Dou, J., Temple, R., Agarwal, R., Wu, K.-M., Walker, S., 2008. New therapies from old medicines. *Nature Biotechnology* 26, 1077–1083.

²⁷ Haute Autorité de Santé, 2014. Commission de la Transparence, Avis 17 septembre 2014. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT_13609_FORSTEO_RI_Avis2_CT13609.pdf

²⁸ U.S. Food and Drug Administration, 2012. FDA approves first anti-diarrheal drug for HIV/AIDS patients. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm333701.htm>



Figure 5 : Sève rouge du *Croton lechleri* (<http://www.arteyfotografia.com/>)

Partie 2 : Les composés organiques volatils des végétaux

1. Rôle fonctionnel des composés organiques volatils dans les plantes

Pour compenser leur immobilité, les plantes biosynthétisent et stockent et/ou excrètent des composés organiques volatils (COVs), métabolites secondaires leur permettant d'interagir avec leur environnement.

Les COVs appartiennent majoritairement aux classes des terpénoïdes, phénylpropanoïdes/benzénoïdes et dérivés d'acides gras.²⁹ Environ 500 téragrammes de carbone sous forme d'isoprène, et probablement une quantité similaire sous forme de monoterpènes seraient diffusés dans l'atmosphère par les végétaux terrestres annuellement.³⁰

Plusieurs fonctions cruciales sont liées aux COVs. Ils favorisent la reproduction végétale en attirant les pollinisateurs et les disperseurs de semence,²⁹ et ils sont impliqués dans les mécanismes d'auto-défense chimique contre les pathogènes et contre les herbivores, soit directement grâce à leur pouvoir répulsif et dissuasif, soit indirectement en attirant les carnivores où leurs proies sont en train de se nourrir. Il s'agit alors d'une sorte « d'appel de secours ».^{31,32,33}

²⁹ Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D.A., Orlova, I., 2006. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25, 417–440.

³⁰ Dicke, M., Loreto, F., 2010. Induced plant volatiles: from genes to climate change. *Trends in Plant Science* 15, 115–117.

³¹ Huang, J., Cardoza, Y.J., Schmelz, E.A., Raina, R., Engelberth, J., Tumlinson, J.H., 2003. Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta* 217, 767–775.

³² De Moraes, C.M., Mescher, M.C., Tumlinson J.H., 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410, 577–580.

³³ Heil, M., 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* 178, 41–61.

Les COVs sont également impliqués dans les réponses aux stress abiotiques, notamment en conférant aux plantes une thermotolérance et en agissant comme antioxydants contre le stress oxydant, causé, par exemple, par l’ozone.^{34,35}

2. Les huiles essentielles

Les COVs des végétaux peuvent être extraits par plusieurs méthodes. Cependant quelques-unes seulement permettent la récupération de ce qu’on appelle huiles essentielles (HEs) définies selon la Pharmacopée européenne comme « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d’une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d’eau (Figure 6), soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L’huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n’entraînant pas de changement significatif de sa composition ». La Pharmacopée précise ensuite que l’HE obtenue par un procédé mécanique sans chauffage est dite « d’expression à froid », elle est recommandée généralement pour extraire les HEs des fruits du genre *Citrus*.³⁶ Cette définition exclut ainsi les produits d’extraction par des solvants ou fluides supercritiques.

³⁴ Loreto, F., Forster, A., Durr, M., Csiky, O., Seufert, G., 1998. On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus ilex* L. fumigated with selected monoterpenes. *Plant Cell and Environment* 21, 101–107.

³⁵ Loreto, F., Velikova, V., 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127, 1781–1787.

³⁶ Pharmacopée Européenne, 2011. Conseil de l’Europe, Strasbourg. 7^{ème} Ed., 1–1404.



Figure 6 : hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger

La majorité des végétaux renferment des HEs, mais généralement en quantité faible. Les plantes qui en produisent en quantité suffisante sont dites « aromatiques ». Elles sont approximativement au nombre de 17500, correspondant à 5 % du total des plantes.³⁷ Les familles renfermant le plus grand nombre d'espèces aromatiques sont les Myrtaceae (eucalyptus, cajepout, niaouli, etc.), Lauraceae (cannelle, camphrier, sassafras, etc.), Rutaceae (citron, orange, bergamote, etc.), Lamiaceae (lavande, thym, sarriette, sauge, menthe, etc.), Asteraceae (millefeuille, absinthe, etc.), Apiaceae (cumin, carvi, anis, fenouil, etc.), Poaceae (citronnelle, vetiver, etc.), Zingiberaceae (gingembre, cardamome, etc.) et Piperaceae (poivre, bétel, etc.).³⁷

On retrouve les HEs dans les différents organes des plantes (fleurs, fruits, graines, feuilles, tiges et racines), stockées dans des structures spécialisées caractéristiques de chaque espèce ou famille. Les structures les plus importantes sont les cellules sécrétrices, les

³⁷ Lawrencet, B.M., 2000. Essential oils: from agriculture to chemistry. The International Journal of Aromatherapy 10, 82–98.

osmophores, les cavités sécrétrices, les canaux sécréteurs, les trichomes glandulaires et les cellules épidermales.³⁸

2.1. Aromathérapie dans l'histoire

Les propriétés des plantes aromatiques ont depuis toujours été mises en profit par l'homme à des fins cosmétiques, religieuses mais aussi thérapeutiques.

Parmi les pratiques les moins connues, les rituels de purification des Aborigènes d'Australie et des Américains indigènes se basaient sur les fumées des plantes aromatiques comme l'Eucalyptus.³⁹

En Inde, la médecine ayurvédique comprenait l'emploi d'une forme primitive d'HE obtenue après avoir broyé puis pressé des plantes aromatiques.⁴⁰ De même, les Chinois utilisaient des plantes aromatiques dans leur système de médecine populaire.⁴¹

Hippocrate proclamait que pour se maintenir en bonne santé, un bain aromatique et un massage parfumé sont quotidiennement indispensables. En plus, il recommandait de brûler des plantes aromatiques pour se protéger contre les maladies contagieuses.⁴²

Les Egyptiens de l'époque pharaonique se servaient de vertus antimicrobiennes des essences des plantes en les utilisant dans leurs techniques d'embaumement. Ainsi les bandages enroulant les momies étaient imprégnés d'un mélange d'huiles de cèdre, de myrrhe, de noix muscade... Cependant, les essences employées n'étaient probablement pas extraites par distillation mais en imbibant les plantes aromatiques dans de la graisse animale

³⁸ Svoboda, K., Hampson, J., Hunter, T., 1998–1999. Secretory tissues storage and chemical variation of essential oils in secretory tissues of higher plants and their bioactivity. *The International Journal of Aromatherapy* 9, 124-131.

³⁹ Lawless, J., 1994. *Aromatherapy and the Mind*. Thorsons, London.

⁴⁰ Miller, L., Miller, B., 1998. *Ayurveda And Aromatherapy: The Earth Essential Guide to Ancient Wisdom and Modern Healing*. Motilal Banarsidass, India.

⁴¹ Arnould-Taylor, W.E., 1992. *A Textbook of Holistic Aromatherapy*. Stanley Thornes, UK.

⁴² Worwood, V.A., 1991. *The Complete Book of Essential Oils and Aromatherapy*. New world library, California.

ou en les trempant dans des huiles végétales comme l'huile d'olive ou de sésame.⁴³ Ce n'est qu'avec Avicenne (980-1037) que vers l'an 1000, le procédé de distillation utilisé de nos jours fut mis au point et perfectionné et la première huile essentielle pure extraite, celle de *Rosa centifolia*.⁴⁴

La distillation fut introduite en Europe au moment des croisades, en retour du Moyen Orient.⁴⁵

C'est surtout à de grands savants français qu'on doit la modernisation et la rationalisation de l'utilisation des huiles essentielles. Ainsi, René-Maurice Gattefossé, père de l'aromathérapie moderne, s'est rendu compte des bienfaits de l'huile de lavande quand il y plongea sa main brûlée dans un accident de laboratoire.⁴⁶ Il se consacra par la suite à l'étude scientifique des propriétés des HEs, créa le terme «aromathérapie» et le lança comme titre d'un livre publié en 1937. Influencé par les travaux de Gattefossé, un chirurgien militaire, Dr. Jean Valnet, à cause d'une pénurie en médicaments, eu recours aux HEs pour désinfecter et traiter les blessures pendant la seconde guerre mondiale. En 1964, il publia son propre ouvrage intitulé «Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes». Des disciples dévoués tels que Marguerite Maury et Micheline Arcier prennent ensuite le relais.⁴⁷

Depuis, les travaux dans ce domaine-là succédèrent et aujourd'hui, de nombreux travaux explorant les propriétés curatives des HEs extraites des plantes aromatiques provenant des quatre coins du monde existent.

⁴³ England, A., 1993. Aromatherapy and Massage for Mother and Baby. Vermilion, London.

⁴⁴ Lardry, J.M., 2007. Les huiles essentielles : introduction à l'aromathérapie. Kinésithérapie la Revue 61, 14–17.

⁴⁵ Deanne, T., 1999. Aromatherapy; Essential oils for essential health. Woodland publishing, UT.

⁴⁶ Ryman, D., 1991. Aromatherapy. Piatkus, London.

⁴⁷ Fischer-Rizzi, S., 1990. Complete Aromatherapy Handbook: Essential Oils for Radiant Health. Sterling publishing company, New York.

2.2. Composition chimique des huiles essentielles

Les HEs sont composées d'hydrocarbures et de leurs dérivés oxygénés, azotés, ou soufrés. Les composés terpéniques constituent la classe la plus grande des composants des huiles essentielles, suivie par les phénylpropanoïdes.⁴⁸

2.2.1. Composés terpéniques

Les terpènes sont des molécules présentant des squelettes carbonés, oligomères de l'isoprène ou 2-méthyl-1,3-butadiène (C_5H_8) (Figure 7), où les monomères sont réunis de manière répétitive dans des liaisons essentiellement tête-queue.⁴⁹ De nombreux dérivés (alcools, aldéhydes et cétones) et des produits de réarrangement sont également considérés comme des composés terpéniques.

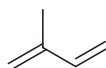


Figure 7 : Isoprène

On classe les divers squelettes terpéniques en fonction du nombre de chaînons isopréniques qui les forment. On distingue alors les monoterpènes qui sont des molécules à 10 atomes de carbones, donc composés de deux unités isopréniques, et les sesquiterpènes qui sont des molécules à 15 atomes de carbones, composées de 3 unités isopréniques. Les monoterpènes et les sesquiterpènes constituent le groupe le plus abondant des constituants des HEs. Ils peuvent être acycliques, monocycliques, bicycliques ou tricycliques (Figure 8). Les diterpènes (C_{20}) sont rares dans les HEs alors que les triterpènes (C_{30}) et les tetraterpènes (C_{40}) n'y sont pas rencontrés.⁵⁰

⁴⁸ Schnaubelt, K., 2011. The healing intelligence of essential oils: The science of advanced aromatherapy. Inner Traditions, Rochester, Vermont.

⁴⁹ Carson, C.F., Hammer, K.A., 2011. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils, in Thormar, H. (ed.), Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. John Wiley & Sons Ltd, UK.

⁵⁰ Tisserand, R., Young, R., 2014. Essential Oil Safety. A Guide for Health Care Professionals. 2nd Ed. Churchill Livingstone, London.

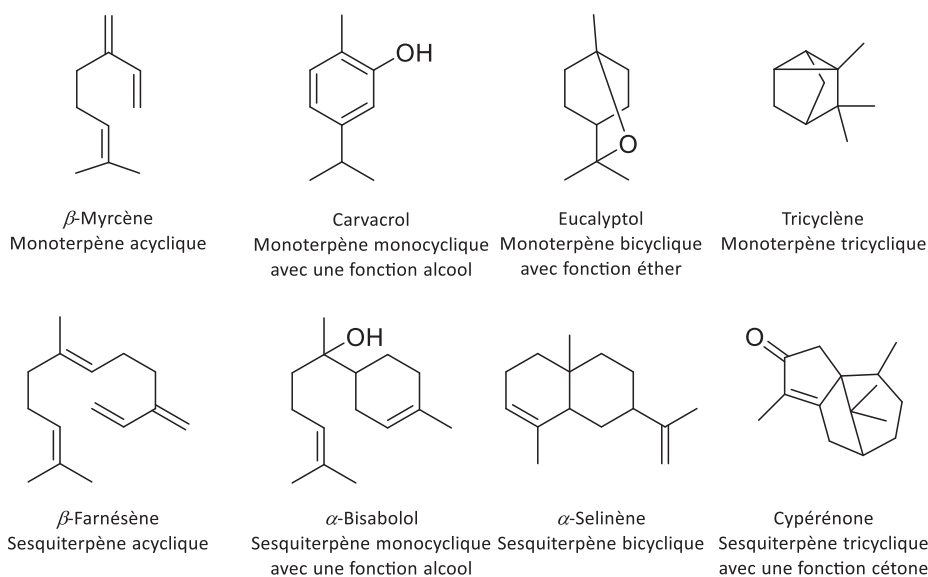


Figure 8 : Les structures de quelques mono- et sesquiterpènes

Cela dit, l'isoprène ne figure pas comme intermédiaire dans la biosynthèse des terpènes. Ce sont l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) qui leur servent de précurseurs. Ces deux derniers sont synthétisés par deux voies distinctes, celle du mévalonate (MVA) et celle du méthylérythritol phosphate (MEP) ou déoxyxylulose phosphate (DXP).

La voie du MVA débute par la condensation de 3 unités acétyl-coenzyme A, passe par le MVA et débouche enfin sur l'IPP (Figure 9).⁵¹ Elle a lieu dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et le peroxysome.^{52,53} Les sesquiterpènes sont essentiellement synthétisés par cette voie-là.⁵⁴

La voie du MEP/DXP débute par la condensation d'une unité pyruvate avec une unité glycéraldéhyde 3-phosphate, passe par le DXP et le MEP pour conduire grâce à une série

⁵¹ Vranova, E., Coman, D., Grussem, W., 2013. Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis Annual Review of Plant Biology 64, 665–700.

⁵² Muhlemann, J.K., Klempien, A., Dudareva, N., 2014. Floral volatiles: from biosynthesis to function. Plant, Cell and Environment 37, 1936–1949.

⁵³ Pulido, P., Perello, C., Rodriguez-Concepcion M., 2012. New insights into plant isoprenoid metabolism. Molecular Plant 5, 964–967.

⁵⁴ Simkin, A.J., Guirimand, G., Papon, N., Courdavault, V., Thabet, I., Ginis, O., Bouzid, S., Giglioli-Guivarc'h, N., Clastre, M., 2011. Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. Planta 234, 903–914.

d'étapes enzymatiques à la synthèse de l'IPP (Figure 9).⁵⁵ Elle est mise en place dans les plastides, et est surtout responsable de la synthèse des mono- et diterpènes.^{56,57}

Enfin, le DMAPP est obtenu par isomérisation de l'IPP. La condensation entre l'IPP le DMAPP produit le géranylpyrophosphate (GPP) précurseur direct des monoterpènes. Le GPP et l'IPP peuvent se condenser à nouveau pour donner le farnésylpyrophosphate (FPP), précurseur direct des sesquiterpènes (Figure 10). De la même façon, le FPP et l'IPP conduisent aux diterpènes.⁵⁸

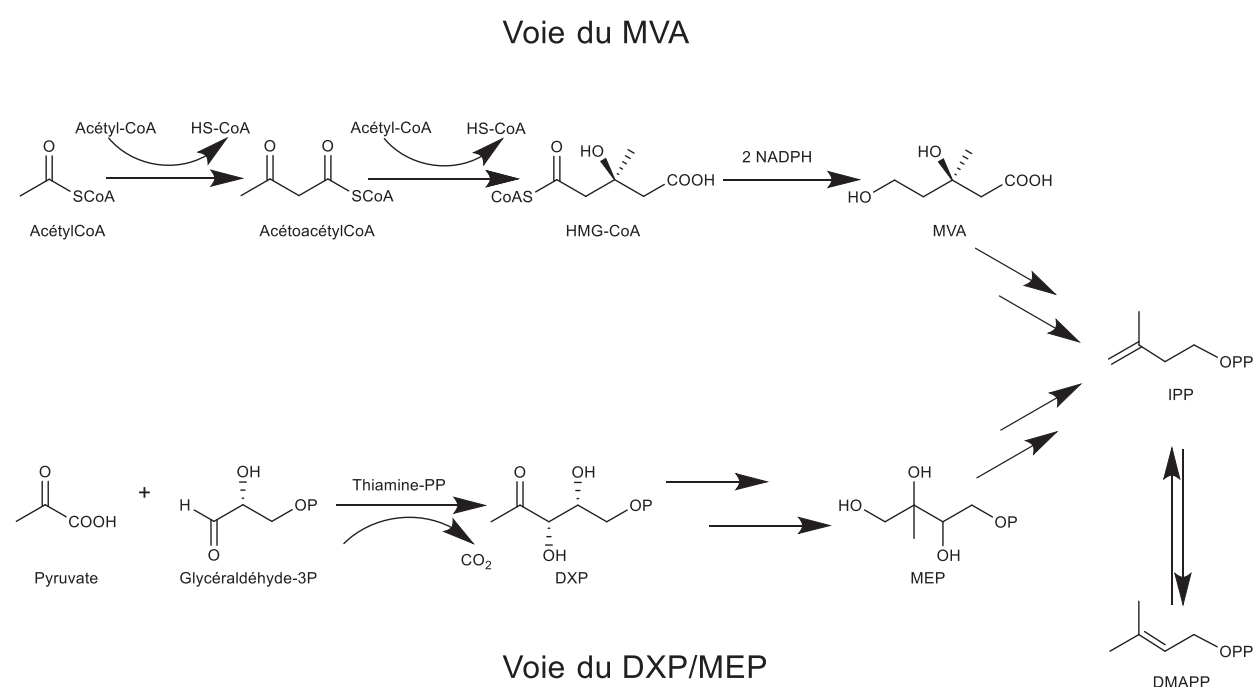


Figure 9 : Différentes voies de biosynthèse des terpènes

⁵⁵ Gräwert, T., Groll, M., Rohdich, F., Bacher, A., Eisenreich, W., 2011. Biochemistry of the non-mevalonate isoprenoid pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 3797–3814.

⁵⁶ Hsieh, M.H., Chang, C.Y., Hsu, S.J., Chen, J.J., 2008. Chloroplast localization of methylerythritol 4-phosphate pathway enzymes and regulation of mitochondrial genes in IspD and IspE albino mutants in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 66, 663–673.

⁵⁷ Knudsen, J.T., Gershenzon, J., 2006. The Chemical Diversity of Floral Scent, in Dudareva, N., Pichersky, E. (eds), *Biology of Floral Scent*. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.

⁵⁸ Başer, K.H.C., Demirci, F., 2007. Chemistry of essential oils, in Berger, R.G., *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer, Germany.

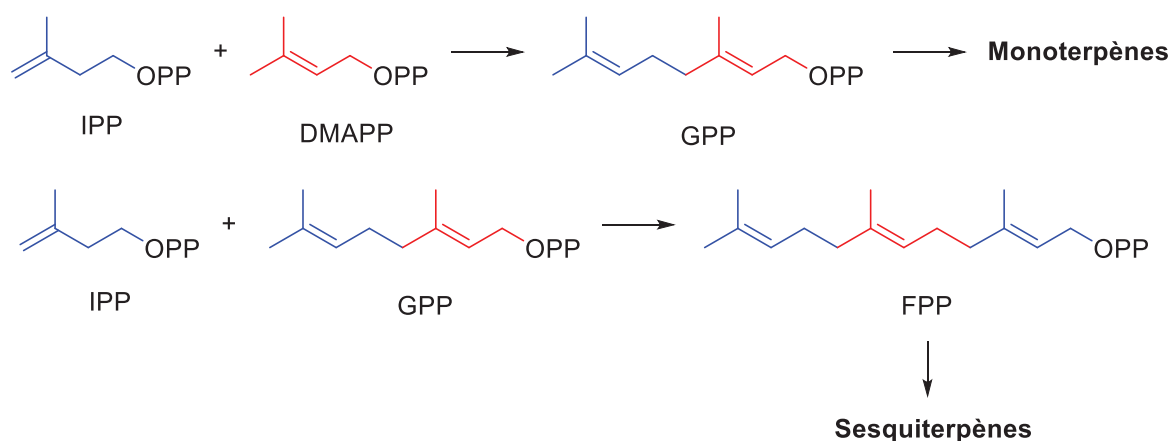


Figure 10 : Monoterpènes et sesquiterpènes à partir de l'IPP et le DMAPP

2.2.2. Phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes sont des composés aromatiques dont le squelette de base est un noyau benzénique substitué par un groupe propényle. Ils sont synthétisés via la voie de l'acide shikimique ayant comme précurseurs directs l'érythrose-4-phosphate et le phosphoénolpyruvate. A partir de la phénylalanine et moins fréquemment la tyrosine produites à partir de l'acide shikimique, on obtient respectivement, par l'action de la phénylalanine/tyrosine ammonia-lyase (PAL/TAL) l'acide *trans*-cinnamique et l'acide *trans*-*p*-hydroxycinnamique (Figure 11). Ces deux derniers subissent ensuite l'action d'enzymes variées donnant ainsi lieu à une vaste gamme de phénylpropanoïdes (Figure 12).^{59,60}

⁵⁹ Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J.K., Kaplan, I., 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist* 198, 16–32.

⁶⁰ Dewick, P.M., 2002. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. 2nd Edition. John Wiley & Sons Ltd, UK.

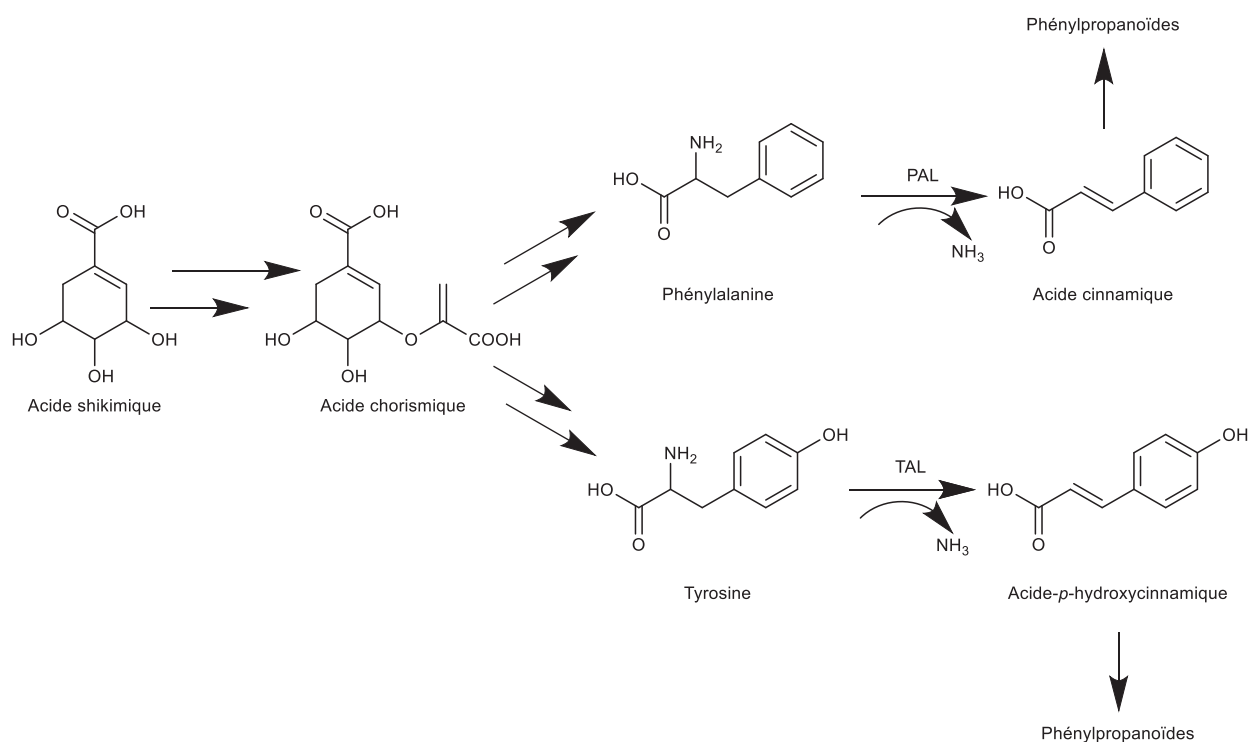


Figure 11 : Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes

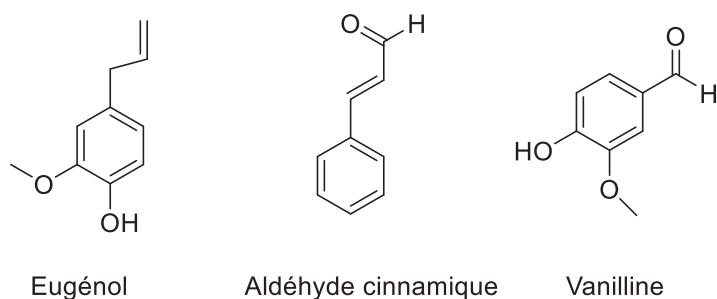


Figure 12 : Structure de quelques phénylpropanoïdes

2.3. Domaines d'application des huiles essentielles

Nombreuses sont les applications des huiles essentielles. Elles s'étendent des domaines de l'agronomie et l'alimentaire à la cosmétologie et la santé.

2.3.1. Application en agronomie

Les pesticides à base d'huiles essentielles prennent tout leur intérêt en agriculture biologique où l'usage de pesticides de synthèse, réputés plus néfastes pour la santé et pour l'environnement, est réglementé et de plus en plus contrôlé dans le cadre de la directive

REACH, en Europe.⁶¹ En fait, les HEs peuvent être utilisées pour protéger les cultures contre les insectes nuisibles sur lesquels ils exercent des effets variés : toxiques, répulsifs, ovicides ou inhibiteurs de croissance.⁶² Les HEs peuvent aussi être exploitées pour leurs propriétés herbicides.⁶³ Ainsi, plusieurs préparations contenant des HEs sont commercialisées en tant que biopesticides. On trouve par exemple, le ValeroTM, un acaricide à base d'huile essentielle de cannelle et l'EcotrolTM, un insecticide / acaricide basé sur les huiles essentielles du romarin et de la menthe poivrée .^{64,65}

Des activités intéressantes de certaines HEs contre des champignons et des bactéries pathogènes des cultures ont été démontrées, justifiant leur utilisation pour le traitement des maladies cryptogamiques et bactériennes des plantes.^{66,67}

En outre, Les HEs constituent une bonne alternative comme additifs alimentaires dans l'alimentation des animaux à la place des promoteurs de croissance antibiotiques dont l'utilisation est restreinte ou même complètement interdite dans de nombreux pays dont l'Union européenne en raison de l'augmentation des préoccupations au sujet de la transmission et de la prolifération des agents pathogènes humains résistants via la chaîne alimentaire.⁶⁸

⁶¹ Koul, O., Walia, S., Dhaliwal, G.S., 2008. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopesticides International* 4, 63–84.

⁶² Mann, R.S., Kaufman, P.E., 2012. Natural product pesticides: Their development, delivery and use against insect vectors. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 9, 185–202.

⁶³ Tworkoski, T., 2002. Herbicide effects of essential oils. *Weed Science* 50, 425–431.

⁶⁴ Isman, M.B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19, 603–608.

⁶⁵ Isman, M.B., Miresmailli, S., Machial, C., 2011. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews* 10, 197–204.

⁶⁶ Tabassum, N., Vidyasagar, G.M., 2013. Antifungal investigations on plant essential oils; A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5, 19–28.

⁶⁷ Mikiciński, A., Sobiczewski, P., Berczyński, S., 2012. Efficacy of fungicides and essential oils against bacterial diseases of fruit trees. *Journal of Plant Protection Research* 52, 467–471.

⁶⁸ Franz, C., Baser, K.H.C, Windisch, W., 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective; A review. *Flavour and Fragrance Journal*. 25, 327–340.

2.3.2. Application dans le secteur de l'alimentaire

Dans les industries alimentaires, on se sert essentiellement des propriétés aromatisantes des HEs. Certains de leurs composants, linalool, thymol, eugénol, carvone, aldéhyde cinnamique, vanilline, carvacrol, citral, et limonène ont été acceptés par la Commission européenne pour leur usage dans ce cadre-là.⁶⁹

Une vaste gamme de conservateurs et d'antioxydants sont utilisés pour prolonger la durée de vie d'un produit alimentaire. Cependant, les additifs artificiels sont accusés d'être cancérigènes et toxiques. Pour faire face à l'inquiétude et la crainte des consommateurs, des travaux se sont ainsi orientés vers l'utilisation d'alternatives naturelles. Les HEs contenant des phénols occupent une place de choix parmi ces palliatifs grâce à leurs propriétés antioxydantes. De surcroît, beaucoup de ces HEs sont antimicrobiennes, actives contre les principaux pathogènes d'origine alimentaires comme *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Salmonella* et d'autres.^{70,71} Pourtant, un nombre limité d'additifs alimentaires contenant des HEs est actuellement commercialisé. On peut citer par exemple le "DMC base naturel", un conservateur qui contient 50 % d'HEs de romarin, de sauge et d'agrumes, et 50 % de glycérol.⁷² En fait, plusieurs contraintes comme leurs arômes puissants qui peuvent nuire aux propriétés organoleptiques des aliments et leurs interactions avec les constituants de la matrice alimentaire, limitent l'application pratique des HEs dans l'industrie alimentaire.⁷³ Ces limitations pourraient être surmontées par

⁶⁹ Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R.L., 2012. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology* 3, 1–24.

⁷⁰ Miguel, M.G., 2010. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules* 15, 9252–9287.

⁷¹ Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell R.E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* 65, 1545–1560.

⁷² Mendoza-Yepes, M.J., Sanchez-Hidalgo, L.E., Maertens, G., Marin-Iniesta, F., 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. *Journal of Food Safety* 17, 47 – 55.

⁷³ Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K., 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities-Potentials and challenges. *Food Control* 47, 381–391.

l'incorporation des HEs dans un emballage actif plutôt que de les utiliser comme ingrédients dans le produit.^{69,74}

2.3.3. Application en cosmétologie

Les odeurs agréables qui caractérisent certaines HEs font d'elles des constituants primaires dans les industries de fabrication de parfums et d'autres produits cosmétiques (déodorants corporels, shampooings, laits, gels douche, crèmes).⁷⁵

En plus, les HEs, surtout grâce à leurs propriétés antioxydantes, confèrent à de nombreux produits cosmétiques leurs propriétés caractéristiques comme agents anti-rides, ou agents pour traitements des troubles de pigmentation de la peau.^{76,77,78}

En outre, l'utilisation des HEs comme préservatifs naturels à la place ou en association avec les préservatifs synthétiques dans les produits cosmétiques prend tout son sens dans ce secteur où le parfum des produits est un atout.^{79,80,81}

⁷⁴ Tongnuanchan, P., Benjakul, S., 2014. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their uses for Food Preservation. *Journal of Food Science* 79, 1231–1249.

⁷⁵ Navarra, M., Mannucci, C., Delbò, M., Calapai, G. 2015. *Citrus bergamia* essential oil: from basic research to clinical application. *Frontiers in Pharmacology* 6, 1–7.

⁷⁶ Ziosi, P., Manfredini, S., Vertuani, S., Ruscetta, V., Radice, M., Sacchetti, G., Bruni, R., 2010. Evaluating essential oils in cosmetics: antioxydant capacity and functionality. *Cosmetics & Toiletries Magazine* 125, 32–40.

⁷⁷ Millou, Y., Fontes, K., Tourel, C., 2010. Cosmetic composition comprising an essential oil extracted from *Helichrysum italicum*. Patent US 7666454 B2.

⁷⁸ Pegeon, A., Pelletier, P., Marion, C., 2014. Use of orange essential oil to treat skin pigmentation disorders. Patent WO 2014122584 A1.

⁷⁹ Yorgancioglu, A., Bayramoglu, E.E., 2013. Production of cosmetic purpose collagen containing antimicrobial emulsion with certain essential oils. *Industrial Crops and Products* 44, 378–382.

⁸⁰ Kunicka-Styczynska, A., Sikora, M., Kalemba, D., 2009. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1903–1911.

⁸¹ Maccioni, M., Anchisi, C., Sanna, A., Sardu, C., Dessi, S., 2002. Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science* 24, 53–59.

2.3.4. Application dans le secteur de santé

Les HEs sont largement utilisées dans le domaine de la santé.

2.3.4.1. Généralités

On peut retrouver par exemple des HEs ou leurs composés terpéniques comme excipients dans les produits pharmaceutiques. La carvone qui est brevetée pour son usage comme agent favorisant l'absorption transdermique des médicaments en est un bon exemple.⁸²

Les physiothérapeutes utilisent souvent les HEs en massage pour soulager les maladies rhumatismales. Dans ce cadre-là, Fibromix®, une marque enregistrée par « Ruska-Aromatica Oy » est constitué par un mélange de neuf HEs : *Cananga odorata*, *Chamaemelum nobile*, *Citrus aurantium*, *Citrus bergamia*, *Citrus reticulata*, *Melissa officinalis*, *Piper nigrum*, *Ravensara aromatica*, *Santalum album* et *Zingiber officinale*. Il vise à soulager les symptômes de la fibromyalgie.⁸³

L'inhalation des vapeurs d'HEs d'eucalyptus et de thé vert par exemple, est utilisée afin de prévenir et soulager les symptômes de maladies du système respiratoire comme le rhume, la grippe et la pneumonie.⁸⁴

Les HEs font même partie des traitements de choix dans l'arsenal thérapeutique post-opératoire, particulièrement en chirurgie esthétique et plastique. Ainsi, l'HE d'hélichryse italienne est utilisée comme anti-inflammatoire, anti-ecchymotique et anti-hématome.⁸⁵

⁸² Leonard, T.W., Mikula, K.K., Schlesinger, M.S., 1989. Carvone Enhancement of Transdermal Drug Delivery. Patent US 4888360 A.

⁸³ Grace, U.-M., 2001. Treating fibromyalgia syndrome with essential oils. The International Journal of Aromatherapy 11, 20–25.

⁸⁴ Vail, W.B., Vail, M.L., 2006. Methods and apparatus to prevent colds, influenzaes, tuberculosis and opportunistic infections of the human respiratory system. Patent US 7150888 B1.

⁸⁵ Voinchet, V., Giraud-Robert, A.-M., 2007. Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. Phytothérapie 5, 67–72.

Les HEs ou leurs constituants sont aussi présents dans le domaine des soins bucco-dentaires. La marque Listerine® (Pfizer Consumer Santé, Morris Plains, NJ, USA), un bain de bouche antiseptique, contient de l'eucalyptol, du menthol, du thymol, et du salicylate de méthyle comme substances actives. Il est commercialisé depuis plus d'un siècle.⁸⁶ En outre, l'eugénate, un mélange d'eugénol et d'oxyde de zinc, est un ciment dentaire provisoire utilisé par les chirurgiens-dentistes comme pansement cicatrisant pour les cavités de carie avant l'obturation définitive, et pour le traitement des alvéolites.⁸⁷

2.3.4.2. *Les huiles essentielles comme antimicrobiens, une utilisation bio-inspirée*

En s'inspirant de leur rôle naturel comme agents de protection et de défense contre divers pathogènes infectant les plantes, les HEs sont intensivement explorées pour leur application potentielle comme antimicrobiens à la place ou en association avec les agents conventionnels. Cette utilisation fait sens dans le contexte actuel de propagation accrue de souches résistantes limitant de plus en plus l'efficacité des antimicrobiens conventionnels.⁸⁸

Les études menées dans ce domaine ont prouvé indubitablement que certaines HEs peuvent agir comme agents antibactériens et antifongiques contre un vaste spectre de souches pathogènes humaines, y compris des souches chimiorésistantes.^{89,90} L'un des avantages des HEs est qu'elles sont construites naturellement comme des mélanges complexes dont le rôle est d'agir sur plusieurs cibles. Cette approche s'oppose à la vision un composé-une cible. Il en résulte que le risque de développement de résistance est moindre.⁶⁶

⁸⁶ Claffey, N., 2003. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. *Journal of Clinical Periodontology* 30, 22–24.

⁸⁷ Schäfer, E., 2000. Matériaux d'obturation canalair. *Revue Mensuelle Suisse Odontostomatologie* 110, 862–869.

⁸⁸ Craciun, A-V., Chiru, D., Marginean, O., 2015. Essential oils, a possible solution to overcome antimicrobial resistance crisis. *Revista Medicala Romana* LXII, 280–283.

⁸⁹ Yap, P.S.X., Yiap, B.C., Ping, H.C., Lim, S.H.E., 2014. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *The Open Microbiology Journal* 8, 6–14.

⁹⁰ Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475.

Par l'association des HEs avec les antibiotiques et les antifongiques conventionnels, on ne recherche pas uniquement l'effet synergétique pouvant en résulter, mais aussi la réduction de la concentration minimale inhibitrice des antimicrobiens, la limitation concomitante de leurs effets indésirables et la limitation du risque de développement de pathogènes chimiorésistants.⁹¹

On peut noter également qu'outre leur action directe sur les organismes pathogènes, les effets anti-inflammatoires et immunostimulants des HEs pourraient aussi contribuer à améliorer l'efficacité des traitements et seconder la guérison.⁹²

En comparaison avec le nombre élevé d'études faites sur les caractéristiques des HEs et de leurs composants, le nombre de travaux cherchant à comprendre leurs mécanismes d'action antimicrobienne reste faible. L'une des difficultés vient du fait que, comme mentionné précédemment, le grand nombre de molécules différentes qui compose les HEs leur confère un caractère polyvalent. Il en résulte que leur activité antimicrobienne n'est souvent pas attribuable à un mécanisme unique, et est plutôt le résultat d'une cascade de réactions impliquant l'ensemble de la cellule cible.⁹³

En général, les activités antimicrobiennes des HEs sont fortement liées à leur hydrophobie. Cette caractéristique leur permet de pénétrer les cellules microbiennes et d'y provoquer des altérations fonctionnelles et structurales. Ainsi, la membrane est souvent altérée, induisant une augmentation de sa perméabilité conduisant à la fuite du cytoplasme et à la dégénérescence cellulaire.⁹⁴ Ce mécanisme justifie le fait que généralement, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux HEs que les bactéries à Gram négatif, dont la présence

⁹¹ Raut, J.S. Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62, 250–264.

⁹² Inouye, S., Abe, S., 2007. Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie* 5, 2–4.

⁹³ Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253.

⁹⁴ Faleiro, M.L., 2011. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, in Méndez-Vilas, A., *The mode of antibacterial action of essential oils*. Formatex, Spain.

de lipopolyccharides dans leur membrane externe associée à des mécanismes d'efflux efficaces défavorise la pénétration des molécules hydrophobes.⁹⁵

Les HEs et leurs composants sont également capables d'interférer avec la voie de biosynthèse des lipides en agissant sur l'ensemble des enzymes impliquées, perturbant ainsi le contenu en acides gras de la bicouche lipidique membranaire. Cela induit une perte de la fluidité de la membrane cellulaire et une augmentation de sa rigidité. Les HEs peuvent aussi agir sur les protéines des micro-organismes et affecter la division cellulaire. Elles sont capables de perturber le métabolisme énergétique microbien en causant une diminution en concentration d'ATP intracellulaire, soit directement à travers la membrane cellulaire perméabilisée, soit indirectement par la fuite du phosphate inorganique ou par bouleversement de la force proton motrice et des équilibres ioniques. Les ATPases membranaires peuvent aussi être inhibées. Certaines HEs agissent de même en inhibant le système de communication « quorum sensing » des cellules microbiennes.⁹⁶

⁹⁵ Hancock, R.E.W., 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in Microbiology* 5, 37–42.

⁹⁶ Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V., 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* 6, 1451–1474.

Partie 3 : Problématique et objectifs de l'étude

1. Problématique

1.1. Induction et diffusion de la résistance aux antimicrobiens.

La résistance aux antimicrobiens est définie par l'OMS comme étant « la résistance d'un micro-organisme à un médicament antimicrobien auquel il était jusque-là sensible. Elle résulte de l'aptitude de certains micro-organismes (bactéries, virus, etc.) à supporter l'attaque de médicaments antimicrobiens tels que les antibiotiques». ⁹⁷

Des phénomènes naturels, concernant aussi bien les mécanismes de résistance que tout autre modification génétique, font que des micro-organismes, initialement sensibles, peuvent acquérir une résistance à un antimicrobien donné. Il s'agit de deux événements génétiques permettant la diversification des micro-organismes et leur adaptation à la survie dans différentes conditions. Ce sont les mutations et les transferts horizontaux. ⁹⁸

L'initiation de la résistance est ainsi aléatoire et n'est généralement pas dépendante de la présence de l'antimicrobien dans le milieu. En fait, des résistances aux antibiotiques ont été décrites chez des micro-organismes isolés dans des habitats naturels coupés du reste du monde, dans les profondeurs du sous-sol terrestre et de l'océan, et qui donc n'ont jamais été confrontés à l'homme ni à ses antibiotiques. ^{99,100}

En revanche, la persistance et la diffusion des micro-organismes résistants à un antimicrobien dans un écosystème est rendue possible par pression de sélection antimicrobienne. En d'autres termes, l'exposition à l'antimicrobien concerné favorise la

⁹⁷ Organisation Mondiale de la santé. Thèmes de santé, Résistance aux médicaments.
http://www.who.int/topics/drug_resistance/fr/

⁹⁸ Andreumont, A., 2005. Comment définir le potentiel de sélection de la résistance bactérienne aux antibiotiques? Médecine et Maladies Infectieuses 35, 207–211.

⁹⁹ Brown, M.G., Balkwill, D.L., 2009. Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. Microbial Ecology 57, 484–493.

¹⁰⁰ Toth, M., Smith, C., Frase, H., Mobashery, S., Vakulenko, S., 2010. An antibiotic-resistance enzyme from a deep-sea bacterium. Journal of the American Chemical Society 132, 816–823.

multiplication et la survie des bactéries résistantes aux dépens des bactéries sensibles qui auraient normalement régné en l'absence de cet antimicrobien.^{101,102}

1.2. Evolution de la résistance aux antimicrobiens

Le 20^{ème} siècle a été marqué par la découverte et l'introduction des premiers médicaments antibiotiques qui ont révolutionné la médecine en contribuant à la lutte contre les maladies infectieuses, qui étaient les principales causes de morbidité et mortalité humaine. Le salvarsan, médicament antisyphilitique introduit en 1909, a été remplacé par la pénicilline en 1940. Dans le même temps, le prontosil, le premier sulfonamide, a été développé en 1935. Les découvertes dans ce domaine se sont depuis lors succédées. Entre les années 1950 et 1970, toutes les classes d'agents antimicrobiens utilisés de nos jours ont été découvertes l'une après l'autre, engendrant un âge d'or de la chimiothérapie antimicrobienne.¹⁰³

Malheureusement, peu de temps après leur introduction, des bactéries résistantes aux antibiotiques ont été, et continuent d'être détectées. Elles sont le revers de la médaille de cette thérapeutique longtemps vue comme miraculeuse. En effet dès 1942, des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline diffusèrent dans les hôpitaux et par la suite dans le reste de la communauté.¹⁰⁴ À la fin des années 60, plus de 80 % des isolats de *S. aureus* étaient résistants à la pénicilline.¹⁰⁵ Des souches résistantes à la streptomycine ont accompagné son introduction en 1947 et d'autres résistantes à la tétracycline furent identifiées seulement 4 ans après l'approbation de ce composé par la FDA en 1952. De

¹⁰¹ Guillemo, D., 2003. Approche pharmaco-épidémiologique de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Revue Française des Laboratoires 354, 53–55.

¹⁰² Levy, S.B., Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature Medicine 10, 122–129.

¹⁰³ Aminov, R.I., 2010. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. Frontiers in Microbiology 1, 1–7.

¹⁰⁴ Rammelkamp C.H., Maxon T., 1942. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. Experimental Biology and Medicine 51, 386–389.

¹⁰⁵ Lowy, F.D., 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Investigation 111, 1265–1273.

même, 2 ans et 3 ans après l'introduction de la pénicilline et la gentamicine, respectivement en 1959 et 1967, des résistances ont été décrites.¹⁰⁶

Les infections fongiques ont été longtemps considérées comme peu importantes et la résistance aux antifongiques a été par conséquent moins étudiée. Cependant, avec l'augmentation de la morbidité et la mortalité chez les patients infectés et surtout ceux qui sont immunodéprimés, et avec l'utilisation accrue des antifongiques, l'émergence de souches résistantes surtout chez les espèces du genre *Candida* est de plus en plus décrite et les recherches dans ce domaine-là se sont intensifiées.¹⁰⁷

Au début, le problème de la résistance était résolu par le remplacement de l'antimicrobien devenu inefficace, par un autre appartenant à une nouvelle classe à laquelle le micro-organisme incriminé était sensible. Hélas, de nos jours, l'applicabilité de cette stratégie, par manque de découvertes récentes, devient de plus en plus limitée.¹⁰⁸ Des conséquences graves en résultent, et il est fréquent désormais d'être confronté à des échecs absolus de traitement d'infections microbiennes. Par exemple, il existe aujourd'hui des souches d'entérobactéries « New Delhi » productrices de la New Delhi métallo-bêta-lactamase (NDM-1) leur conférant un caractère multirésistant. Des cas de gonorrhées intraitables causées par des souches de *Neisseria gonorrhoeae* résistantes aux céphalosporines existent également. Ces souches sont résistantes aux antibiotiques de dernier recours.^{109,110}

¹⁰⁶ Cotner, S., Moore, R., 2011. Arguing for Evolution: An Encyclopedia for Understanding Science. ABC-CLIO, California.

¹⁰⁷ Ghannoum, M.A., Rice, L.B., 1999. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. Clinical Microbiology Review 12, 501–517.

¹⁰⁸ Australian Government, Department of Health, Department of Agriculture, 2015. Responding to the threat of antimicrobial resistance, Australia's first national antimicrobial strategy 2015-2019. [http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/content/1803C433C71415CACA257C8400121B1F/\\$File/amr-strategy-2015-2019.pdf](http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/content/1803C433C71415CACA257C8400121B1F/$File/amr-strategy-2015-2019.pdf)

¹⁰⁹ Struelens, M.J., Monnet, D.L., Magiorakos, A.P., O'Connor, F.S., Giesecke, J., 2010. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. Eurosurveillance 15. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19716>

¹¹⁰ Organisation Mondiale de la Santé. Media centre, Antimicrobial resistance Fact sheet N°194. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>

1.3. Alerte sur la résistance aux antimicrobiens

Le problème de résistance aux antimicrobiens concerne le monde entier, même les pays les plus développés. En fait, 25000 et plus de 23000 personnes décèdent tous les ans, respectivement dans l'Union européenne et aux États-Unis, à la suite d'une infection bactérienne grave et résistante.^{111,112}

La vitesse de propagation des souches microbiennes résistantes est favorisée par une mauvaise utilisation des antimicrobiens. On peut citer notamment la surprescription des antimicrobiens (pour des infections mineures), leur prescription erronée (prescription d'antibiotiques pour des infections virales par exemple), la durée inappropriée des traitements, l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance dans l'alimentation animale, etc. .^{113,114,115}

Partout dans le monde, les organisations sanitaires, de plus en plus conscientes de la sériosité de la situation, usent de tous les moyens possibles pour appeler à une forte mobilisation sur le thème.

Dans ce cadre-là, l'OMS ne cesse de tirer la sonnette d'alarme sur le danger accru de la résistance aux antimicrobiens : « À moins que les nombreux acteurs concernés agissent d'urgence, de manière coordonnée, le monde s'achemine vers une ère post-antibiotiques, où des infections courantes et des blessures mineures qui ont été soignées depuis des

¹¹¹ Organisation Mondiale de la Santé, Bureau Régional de l'Europe. Journée mondiale de la santé 2011 – Résistance aux antibiotiques : pas d'action aujourd'hui, pas de guérison demain.

<http://www.euro.who.int/fr/about-us/whd/past-themes-of-world-health-day/world-health-day-2011-antibiotic-resistance-no-action-today,-no-cure-tomorrow>

¹¹² US Centers for Disease Control and Prevention, 2013. Antibiotic resistance threats in the United States. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>

¹¹³ Shallcross, L.J., Davies, D.S.C., 2014. Antibiotic overuse: a key driver of antimicrobial resistance. *British Journal of General Practice* 64, 604–605.

¹¹⁴ Esposito, S., Esposito, I, Leone, S., 2012. Considerations of antibiotic therapy duration in community and hospital-acquired bacterial infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67, 2570–2575.

¹¹⁵ Gilchrist, M.J., Greko, C., Wallinga, D.B., Beran, G.W., Riley, D.G., Thorne, P.S., 2007. The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives* 115, 313–316.

décennies pourraient à nouveau tuer », prévient le Dr Keiji Fukuda, sous-directeur général de l'OMS pour la sécurité sanitaire.

De nombreuses campagnes ont été ainsi organisées pour mettre en garde contre le mauvais usage des antimicrobiens et pour inciter à prendre les mesures qui s'imposent. La Journée Mondiale de la Santé 2011 avait ainsi pour thème : « Lutte contre la résistance aux antimicrobiens : pas d'action aujourd'hui, pas de guérison demain » et une première semaine mondiale pour un bon usage des antibiotiques ayant pour thème : « Antibiotiques : à manipuler avec précaution » s'est déroulée en novembre 2015.^{116,117}

Bien que L'OMS insiste toujours sur le rôle primordial des laboratoires de microbiologie comme partenaires clés pour la découverte d'antimicrobiens alternatifs et de nouvelles options thérapeutiques efficaces, la situation ne cesse de s'aggraver par le fait que les grands laboratoires pharmaceutiques ont largement délaissé les programmes de recherche sur les antimicrobiens pour investir dans des domaines plus lucratifs (et incontestablement moins difficiles) tels que les maladies chroniques comme l'hypertension, le diabète ou les troubles de l'humeur. En effet, une molécule active sur ces pathologies nécessite une utilisation prolongée par les patients et ne peut pas engendrer de phénomènes de diffusion de chimiorésistance.^{118,119}

2. Objectifs de la thèse

Une des stratégies suggérées pour répondre au problème de la résistance aux antimicrobiens étant de trouver des produits alternatifs visant à restreindre l'usage des antimicrobiens à des cas graves, nous nous sommes orientés vers l'exploration d'huiles

¹¹⁶ Organisation Mondiale de la Santé. Journée mondiale de la Santé - 7 avril 2011. <http://www.who.int/world-health-day/2011/fr/>

¹¹⁷ Organisation Mondiale de la Santé. Centre des médias, Résistance aux antibiotiques Aide-mémoire. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/fr/>

¹¹⁸ Organisation Mondiale de la Santé. Pharmacorésistance-Surveillance de la résistance aux antimicrobiens. <http://www.who.int/drugresistance/surveillance/fr/>

¹¹⁹ Leeb, M., 2005. Le grand désert des antibiotiques. La Recherche 384, 54–57.

essentiels, dont l'efficacité anti-infectieuse est connue de façon empirique depuis des siècles.

Nous nous sommes spécifiquement intéressés aux HEs des plantes libanaises du fait que d'une part le paysage libanais offre une grande diversité d'espèces aromatiques, et que d'autre part l'usage des HEs y est historiquement répandu, y compris dans la médecine traditionnelle.

Il a donc été entrepris de caractériser chimiquement une vingtaine d'huiles essentielles et de mesurer leurs activités antibactériennes et antifongiques.

Enfin, des essais visant à découvrir l'origine de l'activité de certaines de ces huiles et de rechercher de potentielles synergies avec les antimicrobiens conventionnels ont été menés.

Partie 4 : Caractéristiques des principaux micro-organismes utilisés dans l'étude

1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram positif communément appelée staphylocoque doré. C'est un commensal des flores cutanées et des muqueuses humaines et animales. Sa niche écologique principale est constituée par les fosses nasales antérieures. Environ 25 % des sujets humains sains portent *S. aureus* dans leur nez de façon permanente, tandis que 50 % le portent par intermittence.¹²⁰

1.1. Pouvoir pathogène

S. aureus est un pathogène opportuniste qui, lorsque le système immunitaire de l'hôte est affaibli ou la barrière cutané-muqueuse est rompue, devient responsable d'infections allant de troubles cutanés mineurs localisés, telles que les furoncles (Figure 13), à des infections profondes, systémiques, graves et même létales comme la bactériémie, l'endocardite et l'ostéomyélite.¹²⁰



Figure 13 : Furoncle causé par une infection à *S. aureus* (<http://lifeinthefastlane.com/>)

Outre son effet pathogène direct, *S. aureus* est capable de diffuser des toxines spécifiques à l'origine d'affections diverses telles que le choc toxique staphylococcique, les syndromes staphylococciques cutanés bulleux comme le syndrome d'exfoliation généralisée chez les jeunes enfants et l'impetigo bulleux, et les intoxications alimentaires.¹²¹ En fait, *S. aureus* est

¹²⁰ Lindsay, J.A., 2008. *Staphylococcus*: Molecular Genetics. Caister academic press, UK.

¹²¹ Floret, D., Lina, G., 2000. Les toxines staphylococciques et leur pathologie chez l'enfant. La Lettre de l'Infectiologue 9, 406–413.

une cause majeure d'intoxications alimentaires d'origine bactérienne. En France, il vient au deuxième rang après les salmonelles.¹²² L'infection résulte de l'ingestion d'entérotoxines produites dans les denrées alimentaires contaminées suite à leur manipulation pendant la préparation et le traitement, et se manifeste par des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements, des crampes et des diarrhées.^{123,124}

1.2. Traitement et résistance

Suite à son introduction dans les années 1940, la pénicilline G était le traitement de choix pour les infections causées par *S. aureus*. Cependant, des souches productrices de pénicillinase ont rapidement émergé et actuellement, plus de 90 % des isolats sont résistants à la pénicilline.¹⁰⁵ Ce type de résistance a été géré depuis 1961 par l'introduction d'une pénicilline résistante à la pénicillinase, la méthicilline, un β -lactamine produit semi-synthétiquement à partir de la pénicilline. Depuis lors, d'autres pénicillines résistantes à la pénicillinase, comme l'oxacilline, la cloxacilline et la dicloxacilline, regroupées sous le nom de pénicillines du groupe M, ont été développées. Néanmoins, peu de temps après, durant la même année 1961, des souches de *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM) ont été décrites pour la première fois dans les hôpitaux d'Angleterre.¹²⁵ Actuellement, Les SARMS sont parmi les principaux responsables d'infections nosocomiales. Dix-neuf mille patients hospitalisés en meurent chaque année aux Etats Unis.¹²⁶ Cette résistance résulte surtout de l'acquisition, par ces souches, du gène *mecA* codant pour une protéine de liaison aux pénicillines modifiée, présentant ainsi une affinité diminuée pour tous les β -lactamines y

¹²² Institut Pasteur. Staphylocoque.

<http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/staphylocoque>

¹²³ Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research 2, 63–76.

¹²⁴ Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A., Tenover, R.H., 2003. Manual of Clinical Microbiology (8th ed.). ASM Press, Washington, D.C.

¹²⁵ Jevons, M.P., 1961. "Celbenin"-resistant staphylococci. British Medical Journal 1, 124–125.

¹²⁶ Boucher, H.W., Corey, G.R., 2008. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Infectious Diseases 46, 344–349.

compris les céphalosporines, les autres pénicillines du groupe M, et les carbapénèmes.¹²⁷ La résistance des *S. aureus* à la méticilline est généralement associée à une résistance aux aminosides, aux quinolones et aux macrolides ce qui leur confère un caractère multirésistant.¹²⁸ Les glycopeptides et notamment la vancomycine sont désormais recommandés comme traitement de première intention des infections causées par les SARM.¹²⁹ Toutefois, la vancomycine présente les inconvénients d'avoir un coût élevé et une voie d'administration exclusivement intraveineuse, et induit des effets indésirables graves. De plus, des souches de *S. aureus* à sensibilité intermédiaire à la vancomycine (SAIV) et de *S. aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) commencent à émerger. De telles souches ont été retrouvées en 1997 au Japon et en 2002 aux Etats Unis.^{130,131} Quelques antibiotiques récents, considérés comme de dernier recours, comme le linézolide, la daptomycine, et la tigécycline sont utilisés en cas d'échec de traitement à la vancomycine.¹³² Bien que rares, des isolats de *S. aureus* résistants à ces agents ont été hélas décrits.^{133,134,135}

¹²⁷ Archer, G.L., Niemeyer, D.M., 1994. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends in Microbiology* 2, 343–347.

¹²⁸ Leclercq, R., 2002. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 21, 375–383.

¹²⁹ Michel, M.-C., 2013. Infection nosocomiale à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline chez un patient adulte hospitalisé : quel antibiotique choisir? *Pharmactuel* 46, 23–33.

¹³⁰ Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., Tenover, F.C., 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40, 135–136.

¹³¹ Sievert, D.M., Rudrik, J.T., Patel, J.B., McDonald, L.C., Wilkins, M.J., Hageman, J.C., 2008. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. *Clinical Infectious Diseases* 46, 668–674.

¹³² Micek, S.T., 2007. Alternatives to Vancomycin for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Clinical Infectious Diseases* 45, 184–190.

¹³³ Gu, B., Kelesidis, T., Tsiodras, S., Hindler, J., Humphries, R.M., 2013. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68, 4–11.

¹³⁴ Boucher, H.W., Sakoulas, G., 2007. Perspectives on daptomycin resistance, with emphasis on resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 45, 601–608.

¹³⁵ Hope, R., Mushtaq, S., James, D., Pillana, T., Warner, M., Livermore, D.M., 2010. Tigecycline activity: low resistance rates but problematic disc breakpoints revealed by a multicentre sentinel survey in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 2602–2609.

2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif communément appelée bacille pyocyanique ou bacille du pus bleu. Ubiquitaire des milieux humides, on le retrouve dans des environnements assez variés tels que le sol, l'eau, l'air, la surface des végétaux mais aussi, occasionnellement, en commensal de l'organisme humain surtout au niveau du tube digestif avec propagation ultérieure aux sites cutanés humides tels que le périnée et les aisselles. Cette distribution assez large est due à un métabolisme extrêmement versatile lui permettant d'utiliser une grande variété de composés organiques comme source de carbone et de survivre avec des exigences nutritives minimales.¹³⁶

2.1. Pouvoir pathogène

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste qui n'affecte que rarement les personnes en bonne santé. Néanmoins, des infections cutanées primitives à *P. aeruginosa* comme l'omphalite du nouveau-né, le syndrome des ongles verts (Figure 14), l'intertrigo, les "dermites des piscines", sont parmi les troubles que *P. aeruginosa* peut exceptionnellement provoquer chez les sujets sains.¹³⁷ *P. aeruginosa* représente une sérieuse menace plutôt pour les patients immunodéprimés comme ceux souffrant du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et les personnes cancéreuses traitées par chimiothérapie. Il est aussi l'agent principal accompagnant les brûlures graves et la mucoviscidose.^{138,139,140} Par conséquent, *P. aeruginosa* joue un rôle majeur dans les infections nosocomiales. En fait, aux Etats-Unis, il représente la seconde cause de

¹³⁶ Embrey, M., Hunter, P., Sellwood, J., Wyn-Jones, P., Percival, S.L., Chalmers, R., 2004. Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks. Elsevier Ltd, UK.

¹³⁷ Tancrède-Bohin, E., 2002. *Pseudomonas* et infections cutanées. La Presse Thermale et Climatique 139, 23–28.

¹³⁸ Wagner, V.E., Filiatrault, M.J., Picardo, K.F., Iglewski B.H., 2008. *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Pathogenesis Issues, In Cornelis, P. (ed.), *Pseudomonas* genomics and molecular biology, 1st Ed. Caister Academic Press, UK.

¹³⁹ Davies, J.C., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. Paediatric Respiratory Reviews 3, 128–34.

¹⁴⁰ Estahbanati, H.K., Kashani, P.P., Ghanaatpisheh, F., 2002. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. Burns 28, 340–348.

pneumonie nosocomiale et la troisième cause d'infections urinaires nosocomiales.¹⁴¹ En Europe, *P. aeruginosa* occupe le troisième rang dans la liste des pathogènes détectés pour des infections nosocomiales dépistées dans les unités de soins intensifs.¹⁴²



Figure 14 : Syndrome des ongles verts causé par une infection à *Pseudomonas aeruginosa*

La pathogénité de *P. aeruginosa* est attribuée à sa capacité à produire des facteurs de virulence dont l'expression est régulée par deux principaux mécanismes : les systèmes à deux composants et le quorum sensing assurant sa survie et sa multiplication.^{143,144} On distingue d'une part les facteurs associés à la bactérie et qui sont engagés dans l'adhérence, la mobilité et l'invasion tels que l'alginate impliqué dans la formation du biofilm protecteur,

¹⁴¹ National Nosocomial Infections Surveillance System, 1998. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report: data summary from October 1986 to April 1998, issued June 1998. American Journal of Infection Control 26, 522–533.

¹⁴² Vincent, J.L., Bihari, D.J., Suter, P.M., Bruining, H.A., White, J., Nicolas-Chanoine, M.H., Wolff, M., Spencer, R.C., Hemmer, M., 1995. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. Journal of the American Medical Association 274, 639–644.

¹⁴³ Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V., Foglino, M., 2000. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? Trends in Microbiology 8, 498–504.

¹⁴⁴ Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Hamood, A.N., 2000. The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbes and Infection 2, 1721–1731.

le pili et les flagelles et d'autre part, les facteurs sécrétés sous forme de toxines, d'enzymes protéolytiques et lipolytiques, de rhamnolipides et de chromophores.^{145,146}

2.2. Traitement et résistance

Bien que *P. aeruginosa* soit généralement sensible à un grand nombre d'antibiotiques appartenant aux classes des β -lactamines (carboxypénicillines, uréidopénicillines, monobactames, carbapénèmes [à l'exception de l'ertapénème], céphalosporines de quatrième génération, quelques céphalosporines de troisième génération : céftazidime, cefsulodine, céfoperazone), des aminoglycosides (gentamicine, tobramycine, amikacine, nétilmicine, iséпамicine) et des fluoroquinolones (ciprofloxacine et lévofloxacine), l'émergence de souches ayant acquis des résistances mutationnelles peut rendre un ou plusieurs de ces agents inefficaces.

P. aeruginosa s'oppose à l'action des β -lactamines par une résistance enzymatique qui se traduit par une surproduction de la céphalosporinase AmpC normalement faiblement exprimée, ou par acquisition d'autres β -lactamases notamment des β -lactamases et des oxacillinasés à large spectre, et des carbapénémases. Ce pathogène peut également résister au travers de la surproduction de systèmes d'efflux actifs, de la réduction de perméabilité membranaire par altération de la porine OprD, ou de la synthèse de cibles cellulaires altérées.¹⁴⁷ Il est à noter que plus de 120 β -lactamases ont été décrites chez des isolats cliniques de *P. aeruginosa*.¹⁴⁸

La résistance aux aminosides est rendue possible soit par augmentation de l'imperméabilité membranaire, soit par production d'enzymes capables de modifier les aminosides, les empêchant ainsi de se fixer sur le ribosome. Ces enzymes appartiennent à trois classes, à

¹⁴⁵ Ryder, C., Byrd, M., Wozniak, D.J., 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology* 10, 644–648.

¹⁴⁶ Khalifa, A.B.H., Moissenet, D., Thien, H.V., Khedhe, M., 2011. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. *Annales de Biologie Clinique* 69, 393–403.

¹⁴⁷ Pechère J.-C., Köhler, T., 1999. Patterns and modes of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection* 5, 15–18.

¹⁴⁸ Zhao, W.H., Hu, Z.Q., 2010. Beta lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Reviews in Microbiology* 36, 245–58.

savoir les aminosides-*N*-amino-acétyl transférases, les aminosides-*O*-nucléotidyl transférases et les aminosides-*O*-phosphotransférases.¹⁴⁹ La synthèse de cibles cellulaires altérées est un mécanisme de résistance de *P. aeruginosa* aux aminosides qui a récemment émergé.¹⁵⁰ D'autres résistances rares se font par surproduction de système d'efflux actifs.¹⁵¹

Les changements structurels au niveau des enzymes cibles et la surproduction de pompes d'efflux sont les mécanismes par lesquels *P. aeruginosa* résiste aux fluroquinolones.¹⁵²

Outre la résistance d'origine mutationnelle, la capacité que possède *P. aeruginosa* à former des communautés bactériennes denses organisées en biofilms rend le plus souvent les cellules bactériennes beaucoup plus résistantes aux antibiotiques qu'elles ne le sont à l'état planctonique par modification de leur comportement individuel.¹⁵³

L'augmentation actuelle de l'incidence des souches multirésistantes de *P. aeruginosa* constitue une véritable menace menant à l'utilisation de médicaments de dernière ligne comme la colistine ou la polymyxine E, autrefois abandonnées à cause de leur toxicité.¹⁵⁴

3. *Candida albicans*

Candida albicans est un champignon levuriforme. Commensal de l'être humain, il colonise normalement ses muqueuses buccale, gastro-intestinale et urogénitale.

¹⁴⁹ Poole, K., 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, 479–487.

¹⁵⁰ Doi, Y., Arakawa, Y., 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanisms against aminoglycosides. Clinical Infectious Diseases 45, 88–94.

¹⁵¹ Strateva, T., Yordanov, D., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. Journal of Medical Microbiology 58, 1133–1148.

¹⁵² Mérens, A., Delacour, H., Plésiat, P., Cavallo, J.-D., Jeannot, K., 2011. *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. Revue Francophone des Laboratoires 435, 49–62.

¹⁵³ Shawn, A.D., Ferris, W., Ramotar, K., Vandemheen, K., Chan, F., Saginur, R., 2002. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. Journal of Clinical Microbiology 40, 4172–4179.

¹⁵⁴ Sabuda, D.M., Laupland, K., Pitout, J., Dalton, B., Rabin, H., Louie, T., Conly, J., 2008. Utilization of colistin for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology 19, 413–418.

3.1. Pouvoir pathogène

La prolifération de *C. albicans* chez les individus sains est limitée par l'action du système immunitaire et par la présence concomitante d'autres micro-organismes commensaux occupant sa niche potentielle. Cependant, quand une de ces barrières est perturbée, *C. albicans* peut se comporter comme un agent pathogène provoquant des infections cutanéomuqueuses superficielles, mais aussi des infections profondes systémiques pouvant diffuser aux organes internes.¹⁵⁵ Les infections causées par les champignons appartenant au genre *Candida*, sont connues sous le nom de candidoses. *C. albicans* en est le responsable principal.¹⁵⁶ L'une des candidoses superficielles les plus connues est le muguet qui touche la cavité buccale et affecte fréquemment les nouveau-nés (Figure 15). En fait, 5 à 10 % de ces derniers, selon la population à l'étude, sont un jour atteints du muguet.^{157,158} Une autre candidose fréquente est la vulvo-vaginite candidosique. Approximativement trois-quarts des femmes seront touchées au moins une fois au cours de leur vie souvent durant l'âge de procréation.¹⁵⁹ Une des causes principales de sa manifestation est l'antibiothérapie à large spectre capable d'altérer l'équilibre de la microflore vaginale.¹⁶⁰ Les infections par le VIH sont le plus souvent accompagnées par des candidoses superficielles de l'œsophage.¹⁶¹ Quant aux candidoses systémiques, ce sont généralement des infections nosocomiales. Elles

¹⁵⁵ Kim, J., Sudbery, P., 2011. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. The Journal of Microbiology 49, 171–177.

¹⁵⁶ Centers for Disease Control and Prevention. Candidiasis. <http://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/>

¹⁵⁷ Butler, K.M., Baker, C.J., 1988. *Candida*: An increasingly important pathogen in the nursery. Pediatric Clinics of North America 35, 543–63.

¹⁵⁸ Baley, J.E., Kliegman, R.M., Boxerbaum, B., Fanaroff, A.A., 1986. Fungal colonization in the very low birth weight infant. Pediatrics 78, 225–32.

¹⁵⁹ Geiger, A.M., Foxman, B., Gillespie, B.W., 1995. The epidemiology of vulvovaginal candidiasis among university students. American Journal of Public Health 85, 1146–1148.

¹⁶⁰ Xu, J., Schwartz, K., Bartoces, M., Monsur, J., Severson, R.K., Sobel, J.D., 2008. Effect of antibiotics on vulvovaginal candidiasis: a MetroNet study. The Journal of the American Board of Family Medicine 21, 261–268.

¹⁶¹ Institut Pasteur. Candidoses. <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/candidoses>

affectent plus de 250.000 personnes et sont responsables du décès de 50.000 individus dans le monde chaque année.¹⁶²



Figure 15 : Muguet du nourrisson (<https://www.flickr.com/>)

Les principaux facteurs de virulence qui contribuent à la pathogénicité de *C. albicans* sont les adhésines qui favorisent son adhérence à la surface des cellules hôtes par interactions spécifiques de type ligand-récepteur, les enzymes protéolytiques et lipolytiques sécrétées pour supporter l'invasion et enfin son aptitude à passer de la forme levure à la forme filamenteuse.¹⁶³

3.2. Traitement et résistance

Les antifongiques azolés dominent le traitement des candidoses cutanéomuqueuses. Selon les cas (sévérité, immunodépression...), les candidoses systémiques sont principalement traitées par l'un ou la combinaison des agents suivants : préparations à base d'amphotéricine B, antifongiques azolés et échinocandines.¹⁶⁴

Le fluconazole est le chef de file des antifongiques azolés. Son usage à long terme dans la prévention et le traitement des candidoses oropharyngées chez les patients atteints du VIH a induit l'émergence de souches de *C. albicans* résistantes pouvant affecter des patients non

¹⁶² Kullberg, B.J., Arendrup, M.C., 2015. Invasive candidiasis. The New England Journal of Medicine 373, 1445–1456.

¹⁶³ Calderone, R.A., Fonzi, W.A., 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiology 9, 327–335.

¹⁶⁴ Pappas, P.G., Rex, J.H., Sobel, J.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.J., Edwards, J.E., 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. Clinical Infectious Diseases 38, 161–189.

immunodéprimés.^{165,166,167} La formation de biofilms, la surproduction ou la modification de la cible cellulaire de l'antifongique, et la surproduction des pompes d'efflux semblent être les mécanismes qui permettent à *C. albicans* d'échapper à l'action du fluconazole.¹⁶⁸

La résistance de *C. albicans* à l'amphotéricine B et aux échinocandines reste rare.^{169,170,171}

4. *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum est un champignon filamenteux parasite obligatoire de l'homme.

4.1. Pouvoir pathogène

Les dermatophytoses ou infections des tissus kératinisés tels que la peau, les cheveux et les ongles représentent la forme la plus courante d'infections humaines dans le

¹⁶⁵ Rex, J.H., Rinaldi, M.G., Pfaller, M.A., 1995. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 1–8.

¹⁶⁶ Marr, K.A., White, T.C., van Burik, J.A., Bowden, R.A., 1997. Development of fluconazole resistance in *Candida albicans* causing disseminated infection in a patient undergoing marrow transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 25, 908–910.

¹⁶⁷ Marchaim, D., Lemanek, L., Bheemreddy, S., Kaye, K.S., Sobel, J.D., 2012. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstetrics & Gynecology* 120, 1407–1414.

¹⁶⁸ Casalnuovo, I.A., Di Francesco, P., Garaci, E., 2004. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 8, 69–77.

¹⁶⁹ Ellis, D., 2002. Amphotericin B. spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 7–10.

¹⁷⁰ Conly, J., Rennie, R., Johnson, J., Farah, S., Hellman, L., 1992. Disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida albicans*. *The Journal of Infectious Diseases* 165, 761–764.

¹⁷¹ Baixench, M.-T., Aoun, N., Desnos-Ollivier, M., Garcia-Hermoso, D., Bretagne, S., Ramires, S., Piketty, C., Dannaoui, E., 2007. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 1076–1083.

monde.^{172, 173, 174, 175} *Trichophyton rubrum* est le champignon dermatophyte le plus commun.¹⁷⁶ Il est particulièrement reconnu pour être le responsable majeur de l'onychomycose et du tinea pedis communément appelé pied d'athlète (Figure 16).¹⁷⁷



Figure 16 : Tinea pedis ou pied d'athlète (<https://www.flickr.com/>)

Bien que les infections causées par les dermatophytes soient généralement limitées aux régions superficielles de l'organisme, ces champignons peuvent se comporter d'une manière invasive chez les patients immunodéprimés et provoquer des infections systémiques.¹⁷⁸

¹⁷² Vena, G.A., Chieco, P., Posa, F., Garofalo, A., Bosco, A., Cassano, N., 2012. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. *New Microbiologica* 35, 207–213.

¹⁷³ Drakensjö, I.T., Chryssanthou, E., 2011. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005–2009. *Medical Mycology* 49, 484–488.

¹⁷⁴ Welsh, O., Vera-Cabrera, L., Welsh, E., 2010. Onychomycosis. *Clinics in Dermatology* 28, 151–159.

¹⁷⁵ Havlickova, B., Czaika, V.A., Friedrich, M., 2008. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 51, 2–15.

¹⁷⁶ Drake, L.A., Dinehart, S.M., Farmer, E.R., Goltz, R.W., Graham, G.F., Hardinsky, M.K., Lewis, C.W., Pariser, D.M., Skouge, J.W., Webster, S.B., Whitaker, D.C., Butler, B., Lowery, B.J., Elewski, B.E., Elgart, M.L., Jacobs, P.H., Jr Leshner, J., Scher, R.K., 1996. Guidelines of care for superficial mycotic infections of the skin: tinea corporis, tinea cruris, tinea faciei, tinea manuum, and tinea pedis. Guidelines/Outcomes Committee. American Academy of Dermatology. *Journal of American Academy of Dermatology* 34, 282–286.

¹⁷⁷ Kemna, M.E., Elewski, B.E., 1996. A U.S. epidemiologic survey of superficial fungal diseases. *Journal of American Academy of Dermatology* 35, 539–542.

¹⁷⁸ Rodwell, G.E., Bayles, C.L., Towersey, L., Aly, R., 2008. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. *International Journal of Dermatology* 47, 339–343.

4.2. Traitement et résistance

Les principaux agents antifongiques utilisés pour le traitement des dermatophytoses sont les polyènes, les imidazoles, les triazoles, les allylamines et la griséofulvine.¹⁷⁹

Bien que rares, des souches résistantes de *T. rubrum* ont été décrites.¹⁸⁰

¹⁷⁹ Perea, S., Fothergill, A.W., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., 2001. Comparison of *in vitro* activities of variconazole and five established agents against different species of dermatophyte using a broth macrodilution method. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 385–388.

¹⁸⁰ Mukherjee, P.K., Leidich, S.D., Isham, N., Leitner, I., Ryder, N.S., Ghannoum, M.A., 2003. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 82–86.

Partie 5 : Analyse chimique et mise en évidence des propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles

1. Données générales relatives à l'ensemble des huiles essentielles étudiées

1.1. Matériel végétal

Les plantes étudiées ont été sélectionnées en se basant sur un ou plusieurs des critères suivants :

- Nature aromatique
- Endémisme à la région
- Etudes phytochimiques ou biologiques déjà menées sur leurs HEs
- Indications thérapeutiques traditionnelles

Le Tableau 1 donne la liste des plantes récoltées dont l'hydrodistillation a permis de récupérer des HEs, le lieu et la date de récolte, la partie hydrodistillée ainsi que le rendement en HE (v/m). En tenant compte des huiles obtenues à partir d'une même espèce récoltée de différentes régions, et de celles issues de différents organes d'une même plante, 20 HEs ont pu être extraites de 16 plantes appartenant à 7 familles différentes. Des plantes distribuées sur l'ensemble du territoire libanais ont été récoltées.

La famille la plus représentée est celle des Lamiaceae avec 7 espèces. A cette famille appartiennent les espèces *Micromeria myrtifolia*, qui a donné le plus faible rendement en HE (0,18 %), mais aussi *Lavandula vera*, ayant permis d'obtenir le rendement le plus élevé (5,82 %).

Tableau 1 : Informations relatives à l'origine des HEs étudiées

Famille	Espèce	Région de récolte	Coordonnées du lieu de récolte	Date de récolte	N° d'herbier	Partie hydrodistillée	Rendement (%)
Apiaceae	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Bentael	33°47'36.39" N 35°49'3.29" E 970 m	23/06/2012	MNU626	Partie aérienne	0.78
Asteraceae	<i>Achillea falcata</i> L.	Tannourine	34°11'24" N 35°54'05" E 1407 m	16/06/2013	MNIII400	Fleurs	0.71
	<i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i> (K. Koch) Greuter	Beit El Mcheik	34°0'39.67" N 35°59'55.11" E 1204	02/02/2013	MNV399	Partie aérienne	0.58
	<i>Tanacetum argenteum</i> (Lam.) Willd.	Beit El Mcheik	34°0'39.67" N 35°59'55.11" E 1204 m	02/06/2013	MNIII424	Fleurs	0.73
Cupressaceae	<i>Cupressus macrocarpa</i> Hartw.	Achkout	33°59'33.16" N 35°41'59.48" E 1048 m	08/01/2013	MNI017	Feuilles	0.68
	<i>Cupressus sempervirens</i> L. f. <i>horizontalis</i> (Mill.) Voss	Kartaba	34° 5'42.71" N 35°50'51.18" E 1052 m	09/12/2012	MNI018	Feuilles	0.29
						Fruits	0.58
Hypericaceae	<i>Hypericum scabrum</i> L.	Kfardebian	33°59'38" N 35°50'5" E 1818 m	02/06/2013	MNU522	Partie aérienne	0.6
Lamiaceae	<i>Calamintha organifolia</i> (Labill.) Boiss.*	Ouyoun al Siman	33°59'19.47" N 35°50'24.46" E 1911 m	18/08/2013	MNIII180	Partie aérienne	1.16
	<i>Lavandula vera</i> (DC.)	Dhour Zahle	33°50'56.16" N 35°53'18.81" E 1140 m	03/08/2012	MNC181	Partie aérienne	5.82
	<i>Micromeria myrtifolia</i> Boiss. & Hohen**	Nd	Nd	Mars 2013	MNIII175	Partie aérienne	0.18
	<i>Ocimum basilicum</i> L.**	Nd	Nd	Mars 2013	MNC176	Partie aérienne	0.69
	<i>Origanum majorana</i> L.**	Nd	Nd	Mars 2013	MNC177	Partie aérienne	0.72
	<i>Salvia multicaulis</i> Vahl***	Zahle	33°50'50.96" N 35°52'28.13" E 1173 m	28/04/2013	MNV161a	Partie aérienne	0.67
		Bechwet	34°07'52.49" N 36°08'16.41" E 1152 m		MNV161b		1.29
	<i>Salvia tomentosa</i> Miller	Kartaba	34° 5'59.83" N 35°48'43.71" E 1310 m	30/11/2012	MNIII158	Partie aérienne	0.4
Lauraceae	<i>Laurus nobilis</i> L.	Jounieh	33°58'55" N	7/11/2012	MNU001	Feuilles	0.4

			35°37'08" E 20 m			Fruits	0.19
						Tiges	0.21
Pinaceae	<i>Abies cilicica</i> (Antoine & Kotschy) Carrière****	Fneidek	34°27'54.48" N 36°13'10.74" E 1560 m	28/01/2013	MNI015	Feuilles	0.93

*Espèce endémique au Liban et à la Turquie asiatique
 **Plantes achetées à l'état frais d'une herboristerie (Herbatica, Liban)
 ***Espèce endémique au Moyen-Orient
 ****Espèce endémique au Liban, la Syrie et la Turquie asiatique
 Nd : non déterminé

1.2. Analyse chimique des huiles essentielles

1.2.1. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles par GC/MS

La description de la composition des huiles obtenues, les indices de rétention et les stratégies analytiques utilisées pour l'identification des différentes molécules sont présentés dans les différents manuscrits proposés ci-après, et en annexe pour les plantes qui n'ont pas donné lieu à une publication (Annexe 1).

Un total de 148 COVs a été identifié dans les 20 HEs étudiées, avec un nombre moyen de 29 COVs par HE. L'HE de *Salvia multicaulis* présente la diversité chimique la plus élevée (41 COVs) alors que celles de *Calamintha origanifolia* et de *Foeniculum vulgare* sont les moins diversifiées (respectivement 15 et 16 COVs). Les composés identifiés comprennent 76 monoterpènes dont la plupart sont oxygénés (72,0 %), 57 sesquiterpènes répartis en sesquiterpènes non oxygénés (63,2 %) et oxygénés (36,8 %) et un seul diterpène (l'isophyllocladène). On y trouve aussi des phénylpropanoïdes par exemple le *trans*-anéthole qui est le composé le plus abondant dans les HEs de *Micromeria myrtifolia* (17,4 %) et de *Foeniculum vulgare* (22,2 %). *Ocimum basilicum* est encore particulièrement riche en phénylpropanoïdes (18,0 % en total). Quelques composés n'appartenant ni au groupe des terpènes ni à celui des phénylpropanoïdes (alcane, esters, cétones, alcools) ont été également identifiés.

Plusieurs terpènes surviennent fréquemment dans la composition chimique de ces HEs, dont 4 sont biosynthétisés par au moins 80 % des espèces : l' α -pinène se retrouve dans toutes les HEs analysées, le β -pinène dans 85 % des huiles alors que le terpinène-4-ol et l' α -terpinéole sont présents dans 80 % des HEs. Par contre, environ 39 % des composés sont présents dans une seule des HEs étudiées (Figure 17).

Les composés identifiés constituent 68.2 à 95.5 % de la composition totale des huiles étudiées. Toutes les HEs, à l'exception de celle de *Salvia multicaulis* provenant de la région « Zahle », sont majoritairement composées de monoterpènes.

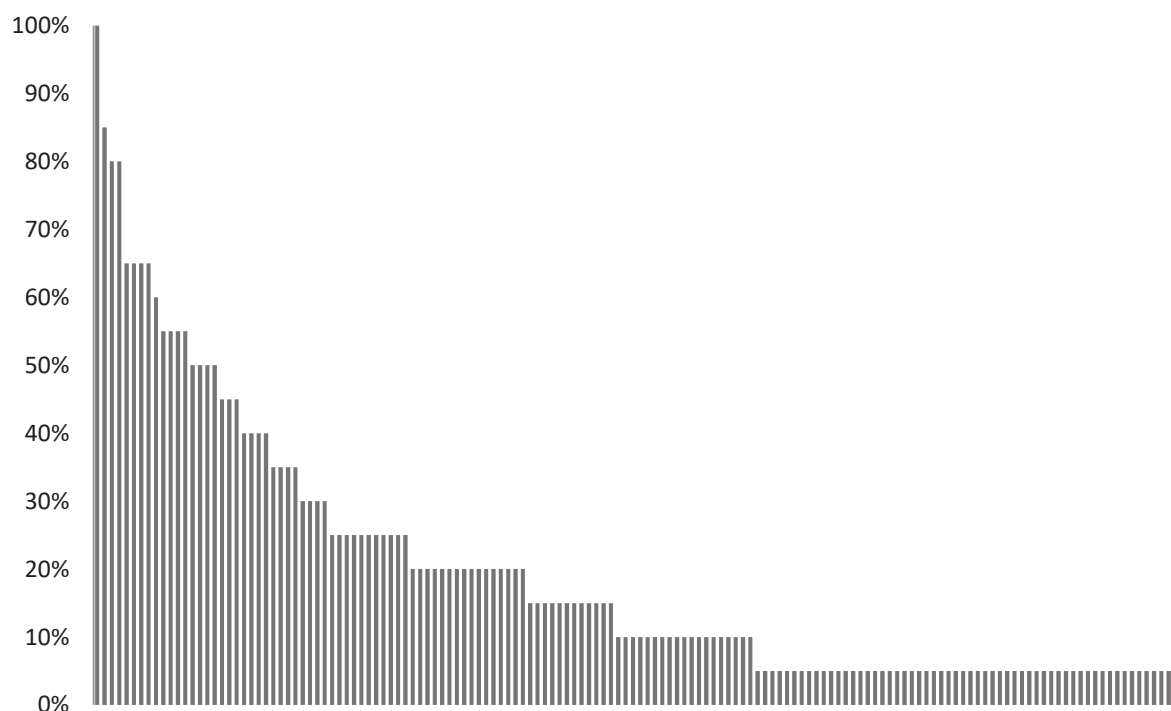


Figure 17 : Proportion relative des espèces contenant chacun des COVs retrouvés dans les 20 huiles essentielles

1.2.2. Confirmation de l'identification des molécules majoritaires par RMN

L'identification des COVs des plantes se fait essentiellement grâce à la GC/MS, cependant cette technique a des limites. Les nouveaux composés ou ceux rarement trouvés dans la nature ne figurent pas dans les bases de données de spectres de masse, et leur spectre de masse ne permet pas alors de les identifier. Pour pallier à ces difficultés, nous avons eu recours à des analyses par résonance magnétique nucléaire. Ainsi les analyses de RMN du proton (^1H), du carbone (^{13}C) ainsi que des corrélations proton-proton (COSY, NOESY) et proton-carbone (HSQC, HMBC) effectuées sur une fraction de l'HE d'*Achillea santolinoides* ont permis d'identifier pour la première fois une nouvelle molécule que nous avons nommée santolinoïdol (article 2).

1.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne de toutes les HEs obtenues a été évaluée lors d'un premier criblage biologique sur quatre micro-organismes pathogènes humains de référence : une bactérie à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus*, une levure *Candida albicans* et un champignon dermatophyte *Trichophyton rubrum*.

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) (calculées en µg/ml) évaluées par la méthode de microdilution sont présentées dans le Tableau 2. L'huile est considérée active quand sa valeur de CMI est égale ou inférieure à 128 µg/ml. Cette valeur est choisie en fonction de l'activité moyenne d'une molécule pure qui est considérée active à des valeurs de CMI voisines de 1 µg/ml. Cette valeur correspond approximativement à l'activité des antimicrobiens de référence, et il est estimé qu'il peut y avoir un facteur 100 entre la CMI d'un mélange et celle d'une molécule pure¹⁸¹.

Les résultats du premier criblage montrent que *S. aureus* et *T. rubrum* sont globalement plus sensibles aux HEs, alors que *P. aeruginosa* et *C. albicans* sont plutôt résistants (Tableau 2).

Lors d'un second criblage mené dans le but d'évaluer le spectre d'action des HEs révélées actives, leurs activités antimicrobiennes ont été ultérieurement testées sur une gamme plus large de pathogènes : Une souche SARM pour les huiles actives sur *S. aureus* d'une part, et *T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *T. tonsurans*, et *T. soudanense* pour les huiles actives sur *T. rubrum* d'autre part.

Par ailleurs, l'activité antimicrobienne des huiles les plus intéressantes a été évaluée en combinaison avec des antibiotiques et antifongiques conventionnels, en recherche d'associations synergiques. Enfin l'investigation de leur toxicité vis-à-vis de cellules humaines saines a mis en évidence leur faible sélectivité privilégiant leur utilisation en application locale.

¹⁸¹ Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D. Vanden, Maes, L., 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* "proof-of-concept". Journal of Ethnopharmacology 106, 290–302.

Les résultats du second criblage, des tests de synergie ainsi que des tests de cytotoxicité sont présentés dans les différents manuscrits proposés ci-après, et en annexe pour ceux qui n'ont pas donné lieu à une publication (Annexes 2, 3, 4, 5).

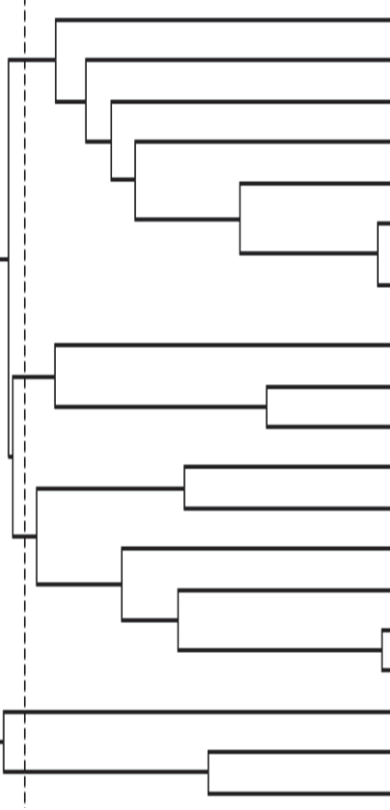
1.4. Classification des huiles essentielles par proximité chimique

Afin de regrouper les HEs selon le degré de similarité de leurs compositions chimiques, le jeu de données obtenu par GC/MS a été traité puis analysé statistiquement avec le logiciel XLSTAT suivant une approche par classification ascendante hiérarchique. Les résultats sont présentés sous forme d'un dendrogramme représentant la dissimilarité chimique (Pearson). La méthode d'agglomération par lien complet a été utilisée.

Ce dendrogramme a été aligné avec un tableau regroupant les activités antimicrobiennes et les composés majoritaires de chaque HE (Tableau 2)

.

Tableau 2 : Dendrogramme représentant le degré de similarité des HEs, associé aux activités antimicrobiennes et composés majoritaires correspondants

	S. <i>aureus</i>	P. <i>aeruginosa</i>	C. <i>albicans</i>	T. <i>rubrum</i>	Composés majoritaires (% ≥ 3)
	<i>Abies cilicica</i> (F)	> 512	> 512	> 512	64 δ -3-Carène, α -pinène, camphène, himachala-2,4-diène, β -caryophyllène, acétate de bornyle, β -phellandrène, α -longipinène
	<i>Salvia tomentosa</i> (PA)	256	> 512	> 512	256 Myrcène, <i>cis</i> -p-menth-2-èn-1-ol, bornéol, viridiflorol, camphor, β -pinène, <i>trans</i> -p-menth-2-èn-1-ol, α -pinène, β -phellandrène, <i>trans</i> -pipéritol
	<i>Salvia multicaulis</i> (Z) (PA)	128	> 512	512	64 <i>trans</i> -Nérolidol, eucalyptol, valéranone, α -pinène, δ -cadinène, spathulénol, myrténol, <i>T</i> -cadinol
	<i>Achillea santolinoides</i> (PA)	128	> 512	256	32 Eucalyptol, santolinoidol, terpinèn-4-ol, α -pinène, <i>trans</i> -pinocarvéol
	<i>Salvia multicaulis</i> (B) (PA)	> 512	> 512	> 512	256 α -Pinène, eucalyptol, myrténol, camphor, camphène, acétate de sabinyle, β -pinène
	<i>Hypericum scabrum</i> (PA)	> 512	> 512	512	64 α -Pinène, D-limonène, myrcène, β -pinène, nonane
	<i>Cupressus sempervirens</i> (F)	> 512	> 512	> 512	512 α -Pinène, α -cedrol, D-limonène, β -pinène, α -acétate de terpinyle
	<i>Cupressus sempervirens</i> (Fr)	> 512	> 512	> 512	512 α -Pinène, β -pinène, D-limonène
	<i>Achillea falcata</i> (Fl)	> 512	> 512	512	256 α -Thujone, β -thujone, pipéritone, eucalyptol, sabinène, terpinèn-4-ol
	<i>Cupressus macrocarpa</i> (F)	> 512	> 512	512	64 Sabinène, terpinèn-4-ol, citronellol, γ -terpinène, citronellal, α -terpinène, camphor
	<i>Origanum majorana</i> (PA)	> 512	> 512	512	128 Terpinèn-4-ol, γ -terpinène, α -terpinène, α -terpinéole, <i>trans</i> -hydrate de sabinène, β -phellandrène, <i>p</i> -cymène, linalool, sabinène
	<i>Ocimum basilicum</i> (PA)	> 512	> 512	> 512	512 Estragole, linalool, méthyleugénol, eucalyptol, <i>trans</i> -cinnamate de méthyle, <i>T</i> -cadinol, <i>trans</i> - α -bergamotène, eugénol
	<i>Lavandula vera</i> (PA)	> 512	> 512	> 512	512 Linalool, terpinèn-4-ol, camphor, bornéol, eucalyptol, acétate de linalyle
	<i>Achillea argentea</i> (Fl)	> 512	> 512	512	64 Santolina alcool, eucalyptol, bornéol, acétate de bornyle, camphor
	<i>Laurus nobilis</i> (Fr)	> 512	> 512	512	64 <i>Trans</i> - β -Ocimène, eucalyptol, β -élémentène, α -pinène, β -pinène
	<i>Laurus nobilis</i> (F)	> 512	> 512	> 512	256 Eucalyptol, α -acétate de terpinyle, méthyleugénol, linalool, terpinèn-4-ol, β -pinène
	<i>Laurus nobilis</i> (T)	> 512	> 512	512	256 Eucalyptol, méthyleugénol, α -acétate de terpinyle, linalool, terpinèn-4-ol, spathulénol
	<i>Calamintha origanifolia</i> (PA)	> 512	> 512	> 512	256 Isomenthone, pulégone, isopinocampnone, pipéritone, néoisomenthol
	<i>Micromeria myrtifolia</i> (PA)	512	> 512	256	128 <i>trans</i> -anéthole, thymol, oxyde de caryophyllène, β -caryophyllène, carvacrol, linalool
	<i>Foeniculum vulgare</i> (PA)	> 512	> 512	> 512	256 <i>trans</i> -anéthole, estragole, β -acétate de fenchyle, <i>p</i> -cymène, α -fenchone, β -phellandrène
	Témoins positifs	1 ^a	0.25 ^b	1 ^c	2 ^c

F = Feuilles, PA = Parties aériennes, Fr = Fruits, Fl = Fleurs, T = Tiges, Z = Région Zahlé, B = Région Bechwét. ^a) Oxacilline, ^b) Gentamicine, ^c) Fluconazole. L'HE est considérée active à une CMI ≤ 128 µg/ml ; les valeurs correspondantes sont marquées en gras.

On peut distinguer cinq groupes rassemblant la totalité des HEs de cette étude.

Les HEs du premier groupe se caractérisent par leur richesse en α -pinène en combinaison avec d'autres terpènes variés. Ce qui retient l'attention dans ce groupe est la présence de presque la totalité des HEs qui ont été sélectionnées pour faire l'objet d'études approfondies (articles et projets d'articles) grâce aux activités antibiotiques et antifongiques intéressantes dont elles ont fait preuve : les HEs de *Salvia multicaulis*, d'*Achillea santolinoides*, d'*Hypericum scabrum* ainsi que des conifères indigènes, *Abies cilicica* et *Cupressus sempervirens*. Il est intéressant de noter que les HEs de *S. multicaulis* et d'*A. santolinoides* sont les seules huiles actives sur *S. aureus*. *A. santolinoides* a aussi enregistré la CMI la plus petite sur *T. rubrum* (32 $\mu\text{g/ml}$). Ce groupe englobe encore une autre espèce appartenant au genre *Salvia*, *S. tomentosa*.

Le second groupe réunit l'ensemble des HEs riches en sabinène et terpinèn-4-ol alors que dans le troisième groupe sont assemblées les HEs caractérisées par leur abondance en eucalyptol en mélange avec d'autres composés. Bien que les HEs des différents organes de *Laurus nobilis* appartiennent à ce même groupe, l'HE des fruits se différencie de celles des feuilles et des tiges dont les compositions sont très proches. Cette différence se traduit par une activité supérieure sur *T. rubrum* (CMI 64 vs 256 $\mu\text{g/ml}$)

L'HE de *Calamintha organifolia*, riche en isomenthone, pulégone, isopinocampone, pipéritone et néoisomenthol, se distingue de toutes les autres huiles.

L'abondance en *trans*-anéthole caractérisant les HEs de *Micromeria mirtifolia* et *Foeniculum vulgare*, fait que ces derniers soient réunis dans le dernier groupe.

2. ARTICLE 1 : Diversité chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Salvia multicaulis* Vahl

Fahed, L., Stien, D., Ouaini, N., Eparvier, V., El Beyrouthy, M. Chemical diversity and antimicrobial activity of *Salvia multicaulis* Vahl essential oils. 2016. Chemistry and Biodiversity 13, 591–595.

2.1. Contexte de l'étude

La famille des Lamiaceae est répandue au Liban avec 136 espèces appartenant à 29 genres. Les plantes de cette famille sont largement utilisées en cuisine et médecine traditionnelle libanaise. En particulier, Le genre *Salvia*, est très reconnu pour ses vertus thérapeutiques. Son nom dérivant du latin « *salvare* » qui signifie sauver, reflète déjà son potentiel. Une plante de ce genre, *Salvia fruticosa*, a été la plus citée dans une enquête ethnopharmacologique récente menée sur les Lamiaceae indigènes du Liban.¹⁸² En fait, les Libanais se servent fréquemment de son huile essentielle qu'ils gardent précieusement chez eux comme remède d'urgence surtout en cas de spasme abdominal, de fièvre et d'infections microbiennes. Un peu plus loin, un dicton populaire provençal "Qui a de la sauge dans son jardin n'a pas besoin d'un médecin" rend hommage aux bienfaits d'une espèce européenne, *Salvia officinalis*.

De notre côté, nous avons choisi d'étudier la composition chimique et les propriétés biologiques de l'huile essentielle de *Salvia multicaulis* Vahl (Figure 18), une plante endémique au Moyen-Orient et qui fait partie du système médicinal folklorique libanais. *S. multicaulis* est une plante multicaule de 30 à 50 cm de hauteur. Ses tiges sont simples, un peu viscidées, finement pubescentes et garnies au surplus de poils étalés. Ses feuilles sont longuement pétiolées, chagrinées, apprimées-canescents, cendrées, simples, cordées à la base, ou munies au-dessous du limbe de deux lobes légèrement distants et très petits. Elle est caractérisée par des pseudo-verticilles nombreux, de 4 à 8 fleurs. Ses feuilles florales inférieures sont lancéolées, dépassant les verticilles, les autres sont plus courtes, ovées à ovées-acuminées. Son calice est hispide, campanulé et bilabié durant l'anthèse et plus ou moins lavé de pourpre. La lèvre supérieure est faiblement tridentée alors que la lèvre inférieure est plus faiblement divisée en deux. Le calice fructifère est très accrescent, membraneux, réticulé et généralement lavé de pourpre. La corolle du calice au temps de l'anthèse est violacée.⁵

¹⁸² El Beyrouthy, M., Dhifi, W., Arnold-Apostolides, N., 2013. Ethnopharmacological survey of the indigenous Lamiaceae from Lebanon. *Acta Horticulturae* 997, 257–276.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des HEs de deux échantillons récoltés de deux régions différentes a montré une remarquable supériorité de l'une sur l'autre. La comparaison de leurs compositions chimiques avec celles des huiles de *Salvia multicaulis* provenant de différentes régions du Moyen-Orient a montré qu'elles appartiennent à deux chimiotypes distincts, et il a été possible, in fine, d'établir que le nérolidol, composé le plus abondant de l'huile active, était à l'origine de son activité antimicrobienne.

Ce travail a donné lieu à la publication ci-après parue dans *Chemistry and Biodiversity*.



Figure 18 : *Salvia multicaulis* Vahl

2.2. Article

Chemical Diversity and Antimicrobial Activity of *Salvia multicaulis*

Vahl Essential Oils

by Laya Fahed^{a)b)}, Didier Stien^{*a)c)}, Naïm Ouaini^{b)}, Véronique Eparvier^{a)}, and Marc El Beyrouthy^{b)}

^{a)} UPR 2301, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 1 Avenue de la Terrasse, Gif-sur-Yvette, FR-91198 France (phone: +33-1-69823610, fax: +33-1-69823784, e-mail: didier.stien@cnrs.fr)

^{b)} Department of Agricultural Sciences, Holy Spirit University of Kaslik, Kaslik, Jounieh, B.P. 446 Lebanon

^{c)} Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Sorbonne Universités, Banyuls/Mer, FR-66650 France

Abstract

The chemical compositions and antimicrobial activities of the essential oils (EOs) of aerial parts of *Salvia multicaulis* Vahl, collected during the same week from two different Lebanese regions, were investigated. The EOs were obtained by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus and characterized by GC and GC/MS analyses. The minimum inhibitory concentrations of these EOs were determined against one Gram-negative and two Gram-positive bacteria, one yeast, and five dermatophytes using the broth microdilution technique. One EO was notably active against *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, and all of the *Trichophyton* species tested. Nerolidol was found to be the major compound in the active oil; nerolidol was also absent from the inactive oil. This study demonstrated that nerolidol shows antimicrobial activity and therefore significantly contributes to the antimicrobial potential of the oil. The chemical diversity of worldwide *S. multicaulis* EOs was analyzed, revealing that the EOs of this study belong to two different chemotypes found in the literature. The nerolidol chemotype appears to be restricted to Lebanon, and it can be used as antimicrobial agent against external bacterial and fungal infections.

Key words:

Salvia multicaulis, Essential oils, Chemical diversity, Antimicrobial activity, Nerolidol.

Introduction

The incidence and severity of microbial infections has increased consistently in recent years [1]. This increase originates, in part, from the extensive use of antifungal and antibacterial agents to treat infections regardless of severity. Topical infections could be treated with plant essential oils (EOs), and oils are widely used for this purpose in traditional and alternative medicines [2]. EOs can also be used in combination with classical drugs to increase activity, reduce toxicity, and limit the risk of resistance development [3].

Salvia multicaulis Vahl (Lamiaceae) is endemic to the Middle East region and is known in Lebanon as 'kasirat al souq' and 'Chafiya', which means the healing plant. This name is in reference to the folk use of the plant against coughs and as febrifuge and emollient [4]. The plant is also used as herbal remedy in Turkey to treat many ailments, such as colds [5], the flu, and tonsillitis [6]. Two samples of *S. multicaulis* EOs from two different Lebanese regions were investigated in a preliminary antimicrobial screening of 20 Lebanese EOs (unpublished data). One EO showed promising antibacterial and antifungal potential. We therefore sought to study the chemical diversity of *S. multicaulis* EOs based on our work and descriptions from the literature in an attempt to identify the origin of the antimicrobial potential of the active chemotype.

Results and Discussion

Chemical Analyses of Essential Oils. *Salvia multicaulis* from Zahle yielded 0.67% essential oil, while *Salvia multicaulis* from Bechwet yielded 1.29% essential oil. Forty-one components, accounting for 83.7% of the Zahle EO composition, were identified. These 41 components accounted for 86.9% of the Bechwet EO. All 41 components were identified and quantified by GC and GC-MS analyses (Table 1).

Table 1: Chemical composition of *Salvia multicaulis* essential oils

RI ^a	RI ^b	Compounds	Compounds (%)	
			Zahle EO	Bechwet EO
938	1076	α -Pinene	4.9	16.3
953	1076	Camphene	1.0	6.1
980	1118	β -Pinene	1.1	3.5
993	1174	Myrcene	0.5	1.3
1025	1280	<i>p</i> -Cymene	0.6	0.6
1034	1213	Eucalyptol	6.5	16.2
1145	1532	Camphor	2.4	6.7
1165	1587	Pinocarvone	0.3	0.3
1167	1719	Borneol	0.9	0.8
1176	1611	Terpinen-4-ol	1.1	0.7
1193	1648	Myrtenal	0.9	0.8
1196	1804	Myrtenol	3.5	6.8
1285	1597	Bornyl acetate	0.4	0.9
1297	1638	Sabinyol acetate	0.9	4.0
1377	1497	α -Copaene	1.3	1.2
1385	1533	β -Bourbonene	0.7	0.2
1415	1612	β -Caryophyllene	2.8	1.6
1437	1628	Aromadendrene	1.4	0.9
1452	1668	α -Humulene	1.8	-
1455	1689	β -Farnesene	1.1	0.3
1463	1661	Alloaromadendrene	0.7	0.6
1478	1704	γ -Muurolene	1.8	0.5
1483	1784	α -Curcumene	-	2.5
1485	1711	β -Selinene	0.6	-
1495	1740	Valencene	1.6	0.5
1500	1740	α -Muurolene	1.2	0.4
1508	1741	β -Bisabolene	1.0	0.4
1515	1776	γ -Cadinene	2.5	1.3
1525	1772	δ -Cadinene	4.6	1.7
1526	1773	α -Cadinene	0.7	0.1
1541	1918	α -Calacorene	0.8	0.2
1566	2050	<i>trans</i> -Nerolidol	12.3	-
1577	2008	Spathulenol	4.0	1.5
1580	2152	Caryophyllene oxide	1.1	0.2
1585	2098	Globulol	0.8	0.5
1591	2104	Viridiflorol	1.4	0.1
1629	2025	<i>epi</i> -Globulol	1.2	0.5
1640	2188	<i>T</i> -Cadinol	3.4	1.3
1645	2145	Torreyol	0.7	0.4
1649	2188	α -Eudesmol	1.1	1.0
1650	2256	α -Cadinol	2.0	1.0
1668	2020	β -Bisabolol	-	2.1
1677	2256	Cadalene	-	0.3
1684	2152	Valeranone	6.1	-
1688	2229	α -Bisabolol	-	0.6
Total identified			83.7	86.9

^{a)} RI^a and RI^b are the retention indices determined relative to a series of n-alkanes (C8-C24) on the apolar DB-5 MS and the polar HP Innowax capillary columns, respectively; -, not detected.

To understand the chemical diversity of *S. multicaulis* species, a hierarchical clustering analysis (Figure 1) was conducted using all of the previously reported essential oils from aerial plant parts and the essential oils investigated in this study. Compounds accounting for more than 4% of at least one EO are listed in Table 2. A composition table consisting of compounds that account for more than 1% of an essential oil was used for statistical analysis.

Three chemotypes were detected; the EOs studied here belong to two different chemotypes. Cluster 1 (chemotype 1) is made up of Iranian EOs only. This chemotype is characterized by high relative proportions of β -caryophyllene, borneol and bornyl acetate, with average proportions of 10.3%, 11.8% and 14.7%, respectively. Chemotype 2 contains the Zahle EO from our study and two previously reported Lebanese EOs. EOs in this cluster have the lowest relative proportions of camphene (average of 1%) and camphor (average of 1.2%) compared to chemotypes 1 (camphene and camphor averages of 6.1% and 10.9%, respectively) and 3 (camphene and camphor averages of 7.8% and 11.7%, respectively). Another characteristic of chemotype 2 is the presence of nerolidol; this compound is absent from the other chemotypes. Nerolidol was the major compound in the Zahle EO. Chemotype 3 includes EOs from several Middle Eastern countries, including Lebanon. The Bechwet EO belongs to this chemotype. The specificity of chemotype 3 originates from the remarkably high proportion of eucalyptol in the oils (20.2% in average). The relative proportion of eucalyptol in the other chemotypes is significantly lower (averages of 5.8% in chemotype 1 and 4.5% in chemotype 2).

Table 2: Literature survey of the chemical diversity and chemotypes of *S. multicaulis* essential oils

Entry	Country of collect ^a	Plant part ^b	Eucalyptol	α -Pinene	β -Caryophyllene	Borneol	Camphene	Camphor	Bornyl acetate	β -Pinene	<i>trans</i> -Nerolidol	Valeranone	α -Eudesmol	Myrtenol	<i>trans</i> -Sabinyl acetate	α -Copaene	Aromadendrene	δ -Cadinene	α -Terpineol	α -Ylangene	Limonene	Spathulenol	<i>p</i> -Cymene	Caryophyllene oxide	Sabinene	<i>cis</i> -Linalool oxide	References
1	I	-	6.9	8.3	8.5	12	7.8	14	7.3	3.5	-	-	-	0.2	-	-	0.4	0.9	0.5	0.1	-	-	4.4	6.2	-	-	[7]
2	I	A. p.	2.1	4.8	5.9	17	5.6	14	19	0.6	-	0.4	-	4.8	-	1.2	0.9	0.6	0.5	-	-	0.8	-	0.9	-	-	[8]
3	I	A. p.	8.4	16	17	6.5	5.1	5	18	2.4	-	-	-	-	-	0.3	-	0.4	-	-	8.3	0.4	0.4	2.1	0.2	-	[9]
4	L	A. p.	3.1	5.5	4.4	1.2	0.9	0.8	0.5	0.9	1.4	-	-	4.6	4.6	6.6	3.9	3	-	0.3	0.3	0.7	2.3	0.8	0.4	-	[10]
5	L	A. p.	3.8	6.6	4	1.9	1.1	0.5	0.4	0.7	1.2	-	-	5.7	5.3	8	4.6	2	-	0.8	0.8	-	0.1	-	0.2	-	[11]
6	L	A. p.	6.5	4.9	2.8	0.9	1	2.4	0.4	1.1	12.3	6.1	1.1	3.5	0.9	1.3	1.4	4.6	-	-	-	4	0.6	1.1	-	-	Our
7	I	G. p.	25	8.5	-	-	1.8	18	0.7	4.4	-	-	-	-	-	-	-	-	7.1	-	-	-	-	-	8.6	8	[12]
8	T	A. p.	26	1.8	1	-	14	13	6.6	4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.1	-	1.1	0.7	-	-	[13]
9	I	A. p.	11	7.5	-	8.6	4.7	11	3.6	3	-	-	-	-	-	-	-	4.8	3.7	4.5	-	-	-	-	-	-	[14]
10	T	A. p.	17	9.3	4.3	1.5	3.5	13	-	-	-	8.5	5.7	-	-	-	0.2	0.2	-	-	-	0.6	-	-	0.4	-	[15]
11	I	F.	25	18	5.8	1.9	8.5	12	7.9	4.6	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	0.5	-	-	-	0.2	0.3	-	[16]
12	T	H. p.	20	22	4.2	7.3	7.8	11	3.3	4.7	0.2	0.9	0.5	2.2	-	0.2	0.5	0.2	0.1	-	-	0.4	-	0.2	-	-	[17]
13	L	A. p.	16	16	1.6	0.8	6.1	6.7	0.9	3.6	-	-	1	6.9	4	1.2	0.9	1.8	-	-	-	1.5	0.6	0.2	-	-	Our
14	I	A. p.	21	17	8.9	8.3	7.5																				[18]
15	I	A. p.	17	12	8.9	2.7	7.5	-	-	6.6	-	-	-	0.6	-	0.7	-	-	-	-	-	2.3	3.7	1.8	3	-	[19]
16	I	L., F.	20	26	1.9	4.7	12	19	1.2	3.5	-	-	-	-	-	0.2	-	0.5	2.2	-	-	-	-	-	-	-	[20]
17	I	S.	25	21	-	5	13	24	5.8	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	-	-	-	-	-	-	-	[16]

^a) I: Iran, L: Lebanon, T: Turkey; ^b) A. p.: Aerial parts, G. p.: Ground parts, H. p.: Herbal parts, F.: Flowers, L.: Leaves, S.: Stems.

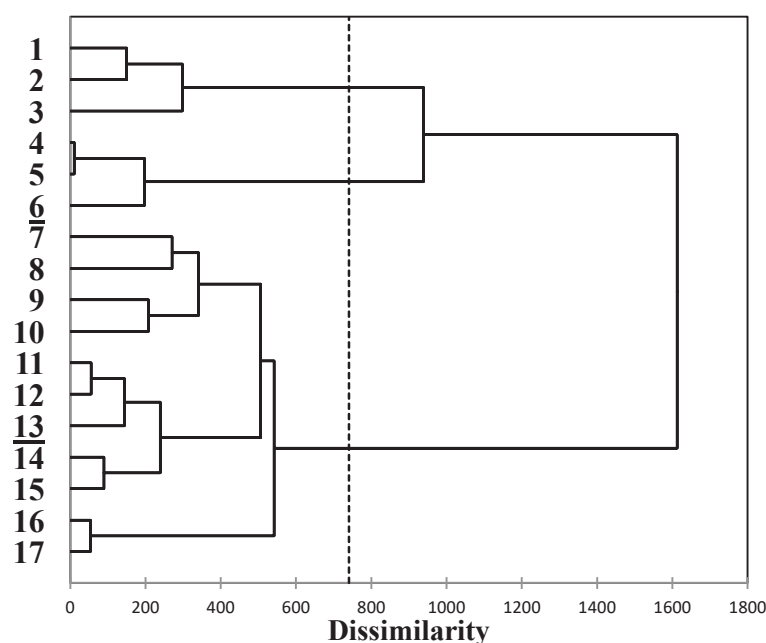


Figure 1: Degree of dissimilarity of the chemical compositions of seventeen *S. multicaulis* EOs (Table 2, Entries 1–17). The dendrogram was obtained by agglomerative hierarchical clustering based on Euclidian distances with Ward's aggregation method. For the composition, country of origin and literature source of each EO, cf. Table 2

Antimicrobial activity. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of both *S. multicaulis* EOs are reported in Table 3. EOs with MICs of 128 $\mu\text{g/ml}$ and below are considered to be interesting for medicinal purposes [21] [22]. Both strains of *S. aureus* were sensitive to the Zahle EO (MIC of 128 $\mu\text{g/ml}$) and resistant to the Bechwet EO (MIC > 512 $\mu\text{g/ml}$). Both EOs were inactive against *P. aeruginosa* (MIC > 512 $\mu\text{g/ml}$) and *C. albicans* (MIC of 512 $\mu\text{g/ml}$ for the Zahle EO and MIC > 512 $\mu\text{g/ml}$ for the Bechwet EO). The Zahle EO exhibited significant activity against all of the dermatophytes tested (MICs from 8 to 64 $\mu\text{g/ml}$), while the Bechwet EO was essentially inactive against the dermatophytes (MICs from 64 to 256 $\mu\text{g/ml}$).

Because nerolidol, the main component of the Zahle EO (12%), was totally absent from the Bechwet EO, the antimicrobial potential of nerolidol alone was evaluated. Nerolidol was found to be active on both *S. aureus* strains and on *T. rubrum* (MICs of 128 and 64 $\mu\text{g/ml}$, respectively), indicating that nerolidol contributes at least partially to the biological activity of the Zahle EO. The antimicrobial activity of nerolidol has been described previously in the literature [23] [24].

Table 3: Antimicrobial activity (MIC in µg/ml) of *S. multicaulis* essential oils and nerolidol

	Zahle EO	Bechwet EO	Nerolidol	Positive control
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	128	> 512	128	1 ^a
M. R. <i>S. aureus</i> (ATCC 33591)	128	> 512	128	1 ^b
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	512	> 512	-	1 ^c
<i>P. aeruginosa</i> (CIP 82118)	> 512	> 512	-	0.25 ^d
<i>T. rubrum</i> (SNB-TR1)	64	256	64	2 ^c
<i>T. mentagrophytes</i> (SNB-TM1)	64	256	-	1 ^e
<i>T. soudanense</i> (SNB-TS1)	32	64	-	2 ^c
<i>T. violaceum</i> (SNB-TV1)	8	256	-	2 ^c
<i>T. tonsurans</i> (SNB-TT1)	64	128	-	4 ^c

^a) Oxacillin; ^b) Vancomycin; ^c) Fluconazole; ^d) Gentamicin; ^e) Itraconazole.

Conclusions

To date, three chemotypes of *S. multicaulis* EOs have been described in the literature. One of these chemotypes appears to be restricted to Lebanon. This chemotype was found to have antimicrobial activity due to the presence of nerolidol. EOs of this chemotype could therefore be used in topical applications against microbial infections. However, additional studies are needed to ensure the suitability and safety of these EOs.

Acknowledgments

This work benefitted from an "Investissement d'Avenir" grant managed by the Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01) and from the support of CNRS Lebanon.

Experimental Part

Plant Material. Aerial parts were collected in April 2013 in the Bekaa Valley, Lebanon in Zahle (33°50'50.96" N 35°52'28.13" E) and Bechwet (34°07'52.49" N 36°08'16.41" E) at altitudes of 1173 and 1152 m, respectively. Plant identification was based on 'Nouvelle flore du Liban et de la Syrie' by Paul Mouterde [25]. The air drying of plant material was

performed in a shady place for two weeks at room temperature. A voucher specimen of each plant was deposited in the Herbarium of the Faculty of Agricultural and Food Sciences of USEK, Lebanon under the registry numbers MNV161a for the Zahle plant and MNV161b for the Bechwet plant.

Essential Oil Extraction. As described in European Pharmacopoeia [26], essential oils were extracted by hydrodistillation for three hours using a Clevenger-type apparatus.

GC Analyses. Analytical gas chromatography was performed on a Thermo Electron Corporation gas chromatograph fitted with a flame ionization detector (FID), a DB-5 MS capillary column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.10 µm) or a fused silica HP Innowax polyethylene glycol capillary column (50 m × 0.20 mm, film thickness 0.20 µm). Helium was used as the carrier gas (0.7 ml/min). The column temperature was initially set to 35°C, gradually increased to 85°C at a rate of 5°C/min, held for 20 min at 85°C, raised to 300°C at 10°C/min and finally held for 5 min at 300°C. Diluted 1 µl samples (1/100, v/v) were manually injected at 250°C in splitless mode. Flame ionization detection (FID) was performed at 310°C.

GC–MS Analyses. GC/MS analyses were performed using an Agilent 6890 gas chromatograph coupled with a 5975 Mass Detector. The 7683B autosampler injected 1 µL of each oil sample. A fused silica capillary column DB-5 MS (30 m × 0.25 mm internal diameter, film thickness 0.1 µm) or a fused silica HP Innowax polyethylene glycol capillary column (50 m × 0.20 mm, film thickness 0.20 µm) was used. Helium was used as the carrier gas (0.7 ml/min). The oven temperature profile was identical to that described above (*cf.* GC Analyses). Mass spectra were recorded at 70 eV with an ion source temperature of 310°C and a transfer line temperature of 320°C. Acquisitions were recorded in full scan mode (50 – 400 amu).

Qualitative and Quantitative Analyses. Most constituents were identified by gas chromatography by comparing their retention indices (RI) with those from the literature [27] [28] or with those of authentic compounds obtained from Sigma-Aldrich (Lebanon and France). Retention indices were determined relative to a homologous series of *n*-alkanes (C8 to C24) analysed under the same operating conditions. Further identification was obtained

by comparing mass spectra on both columns with those provided in the NIST and Wiley 275 libraries, with our homemade library constructed with pure compounds and EOs of known composition or with mass spectra from the literature [27] [29]. The relative concentration of each component was calculated based on the GC peak area without any correction factor and is reported in Table 1.

Statistical analysis. An agglomerative hierarchical-clustering graph was constructed with XLSTAT 2013.4.08 based on Euclidean distance with Ward's aggregation method [30].

Antimicrobial activity. The Gram (–) bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* CIP 82118, the Gram (+) bacterial strains *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), the yeast *Candida albicans* ATCC 10231 and clinical isolates of dermatophytic fungi, including *Trichophyton rubrum* SNB-TR1, *Trichophyton mentagrophytes* SNB-TM1, *Trichophyton soudanense* SNB-TS1, *Trichophyton violaceum* SNB-TV1 and *Trichophyton tonsurans* SNB-TT1 [31], were the microorganisms tested for EO sensitivity in this study.

EO antimicrobial activity was measured using a broth microdilution method according to guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [32-36]. Essential oils and nerolidol were diluted in DMSO and were tested at concentrations ranging from 512 to 16 µg/ml. Microplates were incubated at 37°C for 24 h for bacteria, 48 h for yeasts and 5 days for dermatophytes. The minimum inhibitory concentration (MIC) refers to the lowest concentration that prevented visible microbial growth (Table 3). Oxacillin, gentamicin and vancomycin (16 – 0.03 µg/ml) were used as reference antibiotics. Itraconazole (16 – 0.03 µg/ml) and fluconazole (64 – 0.125 µg/ml) were used as positive controls for the antifungal assays. Antimicrobial standards were purchased from Molekula – Dorset, UK. Nerolidol was purchased from Sigma-Aldrich, France.

References

- [1] G. M. Rossolini, F. Arena, P. Pecile, S. Pollini, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2014**, *18*, 56.
- [2] B. Ali, N. A. Al-Wabel, S. Shams, A. Ahamad, S. A. Khan, F. Anwar, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2015**, *5*, 601.
- [3] W. T. Langeveld, E. J. A. Veldhuizen, S. A. Burt, *Crit. Rev. Microbiol.* **2014**, *40*, 76.
- [4] M. El Beyrouthy, Ph.D. Thesis, Université Droit et Santé – Lille 2, France, 2008.
- [5] U. Çakilcioğlu, M. T. Sengün, I. Türkoğlu, *J. Med. Plants Res.* **2010**, *4*, 567.
- [6] F. Tetik, S. Civelek, U. Cakilcioglu, *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *146*, 331.
- [7] K. Javidnia, R. Miri, M. Soltani, M. Gholami, A. R. Khosravi, *Chem. Nat. Compd.* **2008**, *44*, 654.
- [8] H. Amiri, *J. Med. Plants* **2012**, *41*, 111.
- [9] L. Ahmadi, M. Mirza, *J. Essent. Oil Res.* **1999**, *11*, 289.
- [10] E. Mancini, N. Apostolides-Arnold, L. De Martino, V. De Feo, C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, *Molecules* **2009**, *14*, 4725.
- [11] F. Senatore, N. Apostolides-Arnold, F. Piozzi, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1052*, 237.
- [12] A. Azizi, A. M. Azizi, G. Azizi, *J. Plant Sci. Res.* **2009**, *15*, 39.
- [13] M. Altun, M. Ünal, T. Kocagöz, A. C. Gören, *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **2007**, *10*, 251.
- [14] K. Morteza-Semnani, K. Moshirt, M. Akbarzadeh, *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **2005**, *8*, 6.
- [15] E. Bagci, A. Kocak, *Int. J. Sci. Technology* **2008**, *3*, 13.
- [16] M. Mohammadhosseini, A. Pazoki, H. Akhlaghi, *Chem. Nat. Compd.* **2008**, *44*, 127.
- [17] B. Tepe, E. Donmez, M. Unlu, F. Candan, D. Daferera, G. Vardar-Unlu, M. Polissiou, A. Sokmen, *Food Chem.* **2004**, *84*, 519.

- [18] M. Yousefzadi, A. Sonboli, F. Karimi, S. N. Ebrahimi, B. Asghari, A. Zeinali, Z. *Naturforsch.* **2007**, 62 c, 514.
- [19] M. Paknejadi, F. Foroohi, M. Yousefzadi, *J. Paramed. Sci.* **2012**, 3, 12.
- [20] A. Rustaiyan, S. Masoudi, A. Monfared, H. Komeilizadeh, *Flavour Fragr. J.* **1999**, 14, 276.
- [21] J. L. Rios, M. C. Recio, *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 100, 80.
- [22] E. Houel, A. M. S. Rodrigues, A. Jahn-Oyac, J.-M. Bessiere, V. Eparvier, E. Deharo, D. Stien, *J. Appl. Microbiol.* **2013**, 116, 288.
- [23] H. Skaltsa, D. Lazari, A. Mavromati, E. Tiligada, T. Constantinidis, *Planta Med.* **2000**, 66, 672.
- [24] M. J. Park , K. S. Gwak , I. Yang , K. W. Kim , E. B. Jeung , J. W. Chang , I. G. Choi, *Fitoterapia* **2009**, 80, 290.
- [25] P. Mouterde, 'Nouvelle flore du Liban et de la Syrie', Tome III, Dar El Mashreq, Liban, 1970.
- [26] 'European Pharmacopoeia', 3rd edition, Council of Europe, Strasbourg, 1997.
- [27] W. Jennings, T. Shibamoto, 'Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography', Academic Press, New York, 1980.
- [28] N. W. Davies, *J. Chromatogr. A* **1990**, 503, 1.
- [29] R. P. Adams, 'Identification of essential oil components by gas chromatography/Mass spectroscopy' Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, 2007.
- [30] M. Khoury, D. Stien, N. Ouaini, V. Eparvier, N.A. Apostolides, M. El Beyrouthy, *Chem. Biodivers.* **2014**, 11, 1990.
- [31] C. Nirma, V. Eparvier, D. Stien, *J. Nat. Prod.* **2015**, 78, 159.

[32] Clinical and Laboratory Standards Institute. 'Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved standard', 8th Ed. Document M7-A8, CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.

[33] Clinical and Laboratory Standards Institute. 'Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard', 2nd Ed. Document M38-A2, CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

[34] Clinical and Laboratory Standards Institute. 'Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard', 3rd Ed. Document M27-A3, CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

[35] M. Khoury, M. El-Beyrouthy, N. Ouaini, M. Iriti, V. Eparvier, D. Stien, *Chem. Biodivers.* **2014**, *11*, 825.

[36] A. M. S. Rodrigues, P. N. E. T. Theodoro, C. Basset, M. R. R. Silva, J. Beauchêne, L. S. Espindola, D. Stien, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1706.

3. ARTICLE 2 : Isolation et caractérisation du santolinoïdol, un sesquiterpène bisabolène d'*Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter

Fahed, L., El Beyrouthy, M., Ouaini, N., Eparvier, V., Stien, D. Isolation and characterization of santolinoidol, a bisabolene sesquiterpene from *Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter. 2016. Tetrahedron Letters 57, 1892–1894.

3.1. Contexte de l'étude

Les plantes du genre *Achillea* occupent une place importante dans la médecine traditionnelle libanaise. Elles sont utilisées, selon l'espèce en question, pour traiter divers affections telles que les dermatoses, la toux, les rhumatismes, les troubles de l'estomac, les hémorroïdes et les varices.¹⁸³

Trois espèces d'achillée ont fait l'objet d'étude dans la présente thèse : *Achillea falcata* L., *Achillea santolinoides* subsp. *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter (Figure 19) et *Achillea argentea* (Lam.). Leurs HEs sont relativement dissemblables et celle d'*Achillea santolinoides* s'est distinguée par ses activités antimicrobiennes qui se sont révélées être les plus fortes, parmi les 20 huiles étudiées, sur *Staphylococcus aureus* et *Trichophyton rubrum*.

A. santolinoides est une plante de 10 à 35 cm de hauteur, à tiges cylindriques, non sillonnées. Les feuilles sont laineuses-pubescentes, souvent glabrescentes, les caulinaires linéaires, pinnatiséquées, les segments plus ou moins imbriqués, de 1 mm de long environ, à 3 lobes orbiculaires ou cunéiformes, denticulés, les supérieures atteignant les corymbes. Cinq à quarante capitules sont groupés en corymbes de 1,5 à 5,5 cm de large avec des pédoncules de 1 à 7 mm de long. Les involucre sont largement ovales ou hémisphériques de 2,5 à 5 mm de diamètre. Les bractées sont lancéolées ou oblongues, obtuses ou plus ou moins aigues, étroitement scarieuses, brièvement tomenteuses. Les ligules sont en nombre de 3 à 5, de couleur jaune claire et de 1 à 1,5 mm de long et les fleurs du disque sont en nombre de 15 à 25.⁵

En analysant sa composition chimique, il a été découvert que le spectre de masse de l'un de ses composés majoritaires ne correspondait à aucun des composés déjà enregistrés dans les bases de données spectrales. L'analyse par RMN était par conséquent indispensable à son identification. Sa structure s'est avérée être originale, non décrite antérieurement dans la littérature. Le sesquiterpène ainsi découvert fut nommé santolinoïdol. Sa description structurale a donné lieu à un article soumis et accepté pour publication à *Tetrahedron Letters*.

¹⁸³ El Beyrouthy, M., 2008. Thèse de doctorat. Université Droit et Santé – Lille 2, France.

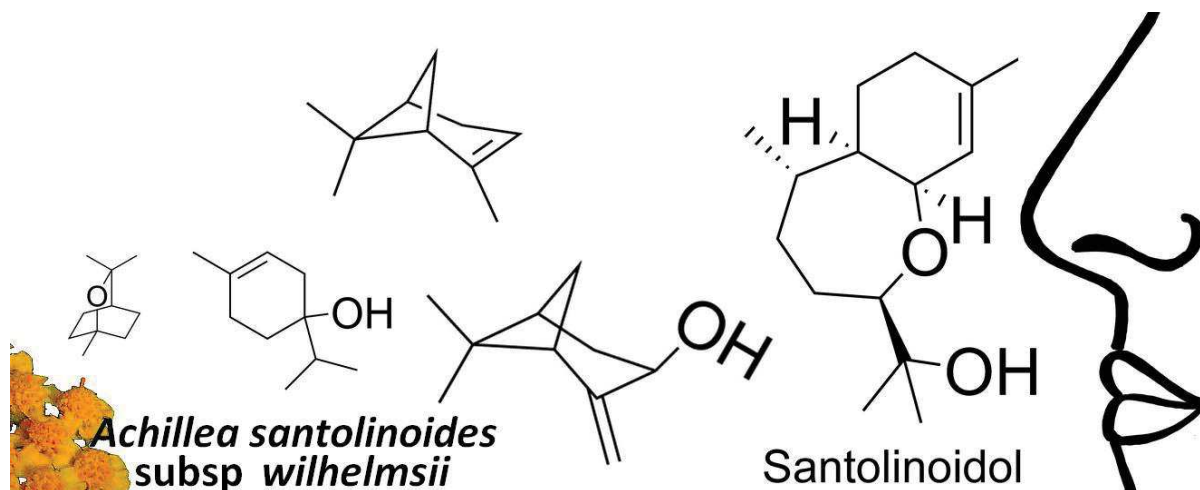


Figure 19 : *Achillea santolinoides* subsp. *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter

3.2. Graphical abstract

Isolation and characterization of santolinoidol, a bisabolene sesquiterpene from *Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter

Layal Fahed, Marc El Beyrouthy, Naïm Ouaini, Véronique Eparvier, Didier Stien



3.3. Article

Isolation and characterization of santolinoidol, a bisabolene sesquiterpene from *Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter

Layal Fahed^{a,b}, Marc El Beyrouthy^b, Naïm Ouaini^b, Véronique Eparvier^a, Didier Stien^{a,c,*}

^a CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

^b Department of Agricultural Sciences, Holy Spirit University of Kaslik, Kaslik, B.P. 446, Jounieh, Lebanon

^c Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France

*Corresponding author. Tel.: +33 4 30 19 24 76. E-mail address: didier.stien@cnrs.fr (D. Stien)

Abstract

The essential oil (EO) obtained by hydrodistillation of aerial parts of Lebanese *Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter was analysed by GC and GC-MS. The identity of the second major compound was uncertain. Its structure was elucidated using 1D and 2D NMR spectroscopy as well as MS data. It appeared to be a new sesquiterpene with a 1-oxa-bicyclo[5,4,0]-undecane skeleton which was named santolinoidol. The EO revealed interesting antimicrobial potential particularly against *Trichophyton* species, *Staphylococcus aureus* and Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with MIC values ranging from 16 to 128 µg/ml.

Keywords:

Achillea santolinoides subsp *wilhelmsii*, Antimicrobial activity, Santolinoidol, Structural determination, Essential oil

Antimicrobial resistance is a global problem and a major public health threat. This applies to both developed and developing countries. In fact, according to the United States Centers for Disease Control and prevention (CDC), there are more than 23000 deaths per year in the US as a direct result of antibiotic-resistant infections.¹ Finding alternative complementary antibiotics to be used for non-lethal conditions can contribute to drive back infectious diseases and pathogen resistance.

The genus *Achillea* comprises many species known for their therapeutic benefits.² It was named after Achilles the hero of Iliad who, according to the legend, used the leaves of *Achillea millefolium* known commonly as Yarrow to treat his wounded soldiers.³ *Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* is used in Pakistan as blood purifier and as cure for stomach-ache, gastric troubles and fever.^{4,5} It is also used in Iran and Turkey for bleeding and wound healing.^{6,7} The main purpose of this study was to characterize the essential oil (EO) of Lebanese *A. santolinoides* subsp *wilhelmsii* and assess its antibacterial and antifungal activities. Although the EO of *A. santolinoides* subsp *wilhelmsii* has been described elsewhere,⁸⁻¹¹ no new metabolites have ever been detected in these oils. In the literature, the major compounds were camphor (48.2%),⁸ linalool (24.2%) and 1,8-cineole (15.5%),⁹ (3Z)-cemberene A (22.6%) and linalool (14.8%),⁹ carvacrol (25.1%) and linalool (11.0%),¹⁰ or carvacrol (22.5%), dihydrocarvone (13.2%), and linalool (12%).¹¹

A. santolinoides subsp *wilhelmsii* aerial part EO was light green and was obtained with a 0.58% yield (v/w). GC and GC-MS analyses led to the identification and quantification of 35 components accounting for 84.3% of the EO (Table 1). However, the comparison with MS databases and kovats index (KI) wasn't enough for the identification of the second most abundant compound (**1**) which accounted for 7.1% of the EO and was eventually characterized by purification and NMR. The other main compounds were eucalyptol (8.0%), terpinen-4-ol (6.9%), α -pinene (6.0%), and *trans*-pinocarveol (3.5%).

Table 1: Partial chemical composition of *Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* essential oil, including compounds accounting for more than 6% of the oil^a

RI ^b	RI ^c	Compounds	(%)
938	1076	α -Pinene	6.0
1034	1213	Eucalyptol	8.0
1176	1611	Terpinen-4-ol	6.9
1651	2160	Santolinoidol (1)	7.1

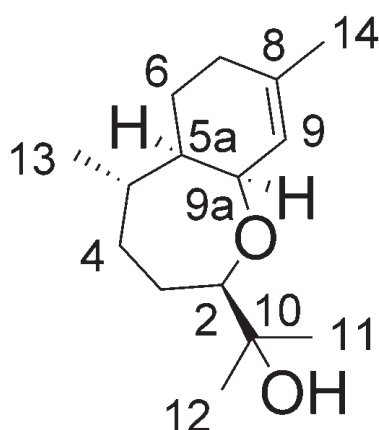
^a) Full table is given in Supplementary material.

^b) Retention index on a DB-5MS column.

^c) Retention index on an HP Innowax column.

A. santolinoides subsp *wilhelmsii* EO was fractionated by HPLC. The fractions were searched by GC-MS in order to point out the one containing the unknown compound **1**, which according to GC accounted for 77% of fraction 20. This fraction was analyzed by high resolution MS and NMR. Compound **1** had a pseudomolecular ion peak at m/z 239.2011 in the positive ionization mode corresponding to the molecular formula $C_{15}H_{27}O_2$. Its planar structure was deduced by analysis of 1H , ^{13}C , COSY, HSQC and HMBC spectral data (Table 2). COSY spectrum made it possible to follow the sequence of protons H-2 to H-13, and a group of protons between H-5a and H-9a forming a cyclohexene ring. Chemical shifts and COSY correlation between H-14 and H-9 indicated that H-14 was linked to a double bond bearing the vinyl proton H-9. 1H and ^{13}C chemical shifts indicated that carbon 9a was linked to an oxygen. Two singlet methyl groups at δ_H 1.13 and 1.18, and δ_C 23.7 and 26.3 were not correlated in COSY. HMBC correlations indicated that these two methyl groups were linked to the same quaternary carbon at δ 72.7. This carbon was linked to an oxygen and HMBC correlations between both H-11 and H-12 with C-2 ascertained the position of this isopropenol moiety which was linked to position 2. Long range proton carbon correlations between H-5 and C-5a and between H-13 and C-5a confirmed the existence of the C-5–C-5a bond. The HMBC correlations between H-9a and C-2 and, conversely, between H-2 and C-9a made it obvious that C-2 and C-9a were linked through an oxygen atom. Overall, the compound was a sesquiterpene with an unusual 1-oxa-bicyclo[5,4,0]-undecane skeleton (Figure 1). The relative stereochemistry was deduced from 1H – 1H vicinal couplings and NOESY spectral data. Selected NOESY correlations are reported in Figure 2. NOE correlation between H-9a and H-2, and H-9a and H-5a, indicated that these protons are on the same

side of the molecule. The stereochemistry at C-5 was doubtful with NOE; however H-5a coupling figure indicated that there were two axial coupling, which could only be explained with an anti-periplanar arrangement of the C-5–H-5 and C-5a–H-5a bonds. Hence, the unknown compound was identified as the 2-(5,8-dimethyl-2,3,4,5,5a,6,7,9a octahydrobenzo[b]oxepin-2-yl)propan-2-ol and was given the trivial name santolinoidol. It can be postulated that the biosynthesis of compound **1** occurs via the epoxidation of a C-2–C-10 double bond followed by the cyclisation of a hydroxyl in C-9a on the epoxide to form a 7-membered ring. The β -sesquiphellandrene, which accounts for 2% of the EO, may be a precursor of santolinoidol.



Santolinoidol (**1**)

Figure 1: Santolinoidol (**1**) from *A. santolinoides* subsp *wilhelmsii*.

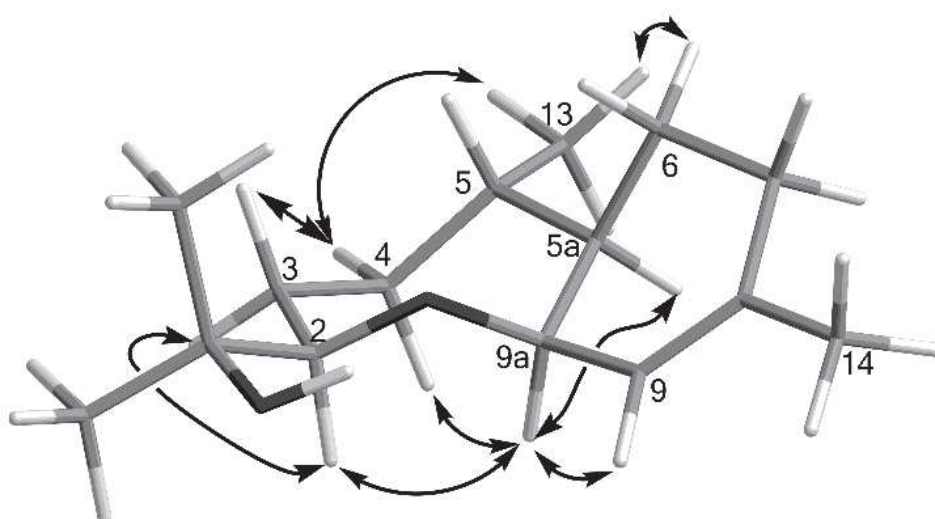


Figure 2: Fig. 2. Selected NOESY correlations in **1**

Table 2: Spectral data for santolinoidol (1) in CDCl₃

Position	δ C, type	δ H, (J in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	90.5, CH	3.24, dd (11.7, 2.9)	3x, 3y	3, 9a, 10, 11	3x, 9a, 12
3	32.0, CH ₂	x: 1.78, m y: 1.45, ddd (16.1, 12.5, 2.9)	2, 3y, 4 2, 3x, 4		2, 3y, 12 3x, 4
4	32.3, CH ₂	1.54-1.64, m	3x, 3y, 5	2, 3, 5, 5a, 13	3y, 9a, 13
5	38.3, CH	1.37, m	4, 13	5a	
5a	46.3, CH	1.15 ddd (16.9, 12.5, 4)	6y, 9a		9a
6	25.1, CH ₂	x: 1.68, m y: 1.38, m	6y, 7x, 7y 5a, 6x, 7x, 7y		6y, 13 6x
7	31.0, CH ₂	x: 1.96, br dd (17.6, 4.4) y: 1.87, m	6x, 6y, 7y 6x, 6y, 7x, 8	5a, 6, 8, 9 5a, 9	9
8	139.0				
9	121.5, CH	5.49, br d (3.7)	7y, 9a, 14	7	7x, 9a, 14
9a	76.4, CH	3.93, br t (4.0)	5a, 8, 14	2, 6, 8, 9	2, 4, 5a, 9
10	72.1				
11	23.7, CH ₃	1.13, s		2, 10, 12	
12	26.3, CH ₃	1.18, s		2, 10, 11	2, 3x
13	22.6, CH ₃	1.03, d (6.6)	5	4, 5, 5a	4, 6x
14	23.6, CH ₃	1.72, br s	8, 9a	7, 8, 9	9

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of *A. santolinoides* subsp *wilhelmsii* EO are presented in Table 3. EOs with MICs of 128 µg/ml and below are generally considered useful as antimicrobial agents.^{12,13}

Table 3: Antimicrobial activity (MIC in µg/ml) of *A. santolinoides* subsp *wilhelmsii* EO

Strain tested ^a	<i>A. santolinoides</i> EO	Reference compound
<i>S. aureus</i>	128	1 ^b
<i>S. aureus</i>	128	1 ^c
<i>C. albicans</i>	256	1 ^d
<i>P. aeruginosa</i>	> 512	0.25 ^e
<i>T. rubrum</i>	32	2 ^d
<i>T. mentagrophytes</i>	32	1 ^f
<i>T. soudanense</i>	16	2 ^d
<i>T. violaceum</i>	16	2 ^d
<i>T. tonsurans</i>	16	4 ^d

^a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 33591; *Candida albicans* ATCC 10231; *Pseudomonas aeruginosa* CIP 82118; *Trichophyton rubrum* SNB-TR1; *Trichophyton mentagrophytes* SNB-TM1; *Trichophyton soudanense* SNB-TS1; *Trichophyton violaceum* SNB-TV1; *Trichophyton tonsurans* SNB-TT1

^b Oxacillin; ^c Vancomycin; ^d Fluconazole; ^e Gentamicin; ^f Itraconazole

A. santolinoides EO was most active on dermatophytes (MIC values 16-32 µg/ml). It also exhibited a significant activity against both strains of *Staphylococcus aureus* (MIC 128 µg/ml). *Candida albicans* was moderately sensitive (MIC 256 µg/ml), whereas *Pseudomonas aeruginosa* was resistant (MIC > 512 µg/ml). The origin of the antimicrobial activity remains

uncertain. The oil is composed of many compounds and none of them really dominates. However, the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is principally attributed to its terpinen-4-ol content.¹⁴ Hence, this compound may have had an important contribution to the whole activity. Unfortunately, the fraction enriched in santolinoidol was obtained in very small amount and could not be tested alone. In conclusion, this letter reports the first description of santolinoidol, an unusual 1-oxa-bicyclo[5,4,0]-undecane sesquiterpene isolated in the essential oil of *Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii*.

Acknowledgements

This work has benefited from an "Investissement d'Avenir" grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01) and from the support of CNRS Lebanon.

References

1. U. S. Centers for Disease Control and Prevention 2013, <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
2. Saeidnia, S.; Gohari A. R.; Mokhber-Dezfuli N.; Kiuchi F. *Daru* **2011**, *19*, 173–186.
3. Couplan, F. In *Les plantes et leurs noms : Histoires insolites*; Quae : France, 2012; Vol. 1, pp 1–224.
4. Bazai, Z. A.; Tareen, R. B.; Achakzai, A. K. K.; Batool, H. *Phyton* **2013**, *82*, 69–74.
5. Tareen, R. B.; Bibi, T.; Khan, M. A.; Ahmad, M.; Zafar, M. *Pak. J. Bot.* **2010**, *42*, 1465–1485.
6. Mosaddegh, M.; Esmaeili, S.; Naghibi, F.; Moghadam, M. H.; Haeri, A.; Pirani, A.; Moazzeni, H. *J. Herbs Spices Med. Plants* **2012**, *18*, 211–221.
7. Özgen, U.; Kaya, Y.; Houghton, P. *Turk. J. Biol.* **2012**, *36*, 93–106.
8. Bagci, E.; Koçak, A.; Yüce, E. *Science and Eng. J. Firat Univ.* **2008**, *20*, 251–255.
9. Hooshyari, P.; Sharafzadeh, S.; Zakerin, A. *Tech. J. Eng. Appl. Sci.* **2012**, *2*, 440–443.
10. Javidnia, K.; Miri, R.; Sadeghpour, H. *Daru* **2004**, *12*, 63–66.
11. Kotan, R.; Dadasoglu, F.; Kordali, S.; Cakir, A.; Dikbas, N.; Cakmakci, R. *J. Agric. Technol.* **2007**, *3*, 299–306.
12. Rios, J. L.; Recio, M. C. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 80–84.
13. Houël, E.; Rodrigues, A. M. S.; Jahn-Oyac, A.; Bessiere, J.-M.; Eparvier, V.; Deharo, E.; Stien, D. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *116*, 288–294.
14. Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Riley, T. V. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 50–62.

Supplementary material

Isolation and characterization of santolinoidol, a bisabolene sesquiterpene from *Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter

1. Experimental

1.1. General Experimental Procedures

GC analyses were performed on a Thermo Electron Corporation gas chromatograph fitted with a flame ionization detector (FID), a DB-5 MS capillary column (30 m × 0.25 mm) with 0.1 µm film thickness or a fused silica HP Innowax polyethylene glycol capillary column (50 m × 0.20 mm, film thickness 0.20 µm). Helium was the carrier gas (0.7 ml/min). The column temperature was initially set to 35 °C before being gradually increased to 85 °C at 5 °C/min, held for 20 min at 85 °C, raised to 300 °C at 10 °C/min and finally held for 5 min at 300 °C. Diluted 1 µl samples (1/100, v/v) were injected at 250 °C manually and in the splitless mode. Flame ionisation detection (FID) was performed at 310 °C. GC/MS analyses were performed using an Agilent 6890 gas chromatograph coupled with 5975 Mass Detector. The 7683 B auto sampler injected 1 µL of each oil sample. A fused silica capillary column DB-5 MS (30 m × 0.25 mm internal diameter, film thickener 0.1 µm) or a fused silica HP Innowax polyethylene glycol capillary column (50 m × 0.20 mm, film thickness 0.20 µm) was used. Helium was the carrier gas (0.7 ml/min). The oven temperature program was identical to that described above (*cf.* GC analyses). The mass spectra were recorded at 70 eV with an ion source temperature of 310 °C and a transfer line heated to 320 °C. The acquisition was recorded in full scan mode (50 – 400 amu). The optical rotation was measured on an Anton Paar MCP 300 polarimeter in a 350 µL cell that was 100 mm long. The nuclear magnetic resonance (NMR) spectra (¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC and NOESY) were recorded on a Bruker 600 MHz spectrometer equipped with a 1 mm inverse detection probe, in CDCl₃ as solvent. The spectra were referenced to tetramethylsilane (TMS), chemical shifts (δ) are given in ppm, and coupling constants are reported in Hz. High-resolution ESITOFMS measurements were performed using a Waters Acquity UPLC system with column bypass coupled to a Waters Micromass LCT Premier time-of-flight mass spectrometer equipped with an electrospray interface (ESI). Analytical and preparative HPLCs were conducted with a Gilson system equipped with a 322 pumping device, a GX-271

fraction collector, a 171 diode array detector, and an ELSII preparative electrospray nebulizer detector. Columns used for these experiments included a Phenomenex Luna C18 (4.6 × 250 mm, 5 µm) for analytical HPLC, and a Phenomenex Luna C18 (21.2 × 250 mm, 5 µm) for preparative HPLC. The flow rate was set to 1 or 21 ml/min, respectively, using a linear gradient of water mixed with an increasing proportion of acetonitrile (H₂O/CH₃CN: 70/30 to 0/100 over 35 min and then 100% CH₃CN for 25 min). A solution of EO in DMSO was prepared at a concentration of 1 mg/ml for analytical HPLC. For preparative HPLC 300 µL of a solution at 100 mg/ml in DMSO was injected. The antimicrobial standards were purchased from Molekula – Dorset, UK.

1.2. Essential oil extraction

Aerial parts were collected in February 2013 from Mount Lebanon (34°0'39.67" N 35°59'55.11" E). The plant identification was based on 'La nouvelle flore du Liban et de la Syrie' by Mouterde (1966).¹ A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Department of Botany and Medicinal plants, Holy Spirit University, Faculty of Agricultural and Food Sciences (USEK-Lebanon) under the registry number MNV399. Air drying of Plant materiel was performed in a shady place for two weeks at room temperature. According to the European Pharmacopoeia (1997),² the extraction of essential oils was carried out by hydrodistillation for three hours using a Clevenger-type apparatus.

1.3. Identification and quantification of EO compounds

Most constituents were identified by gas chromatography by comparing their retention indices (RI) with those from the literature,^{3,4} or with those of authentic compounds obtained from Sigma-Aldrich (Lebanon and France). The retention indices were determined relatively to a homologous series of *n*-alkanes (C8 to C24) analyzed under the same operating conditions. Further identification was obtained by comparing mass spectra with those provided in the NIST and Wiley 275 libraries, our home-made library constructed with pure compounds and EOs of known composition or with mass spectra from the literature.^{4,5}

Table S1: Chemical Composition of *Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* essential oil

RI ^a	RI ^b	Compounds	(%)
938	1076	α -Pinene	6.0
953	1076	Camphene	1.1
980	1118	β -Pinene	1.7
993	-	2,3-dehydro-1,8-cineole	0.8
1005	1188	α -Phellandrene	1.1
1013	1188	α -Terpinene	2.2
1025	1280	<i>p</i> -Cymene	2.4
1034	1213	Eucalyptol	8.0
1057	1255	γ -Terpinene	2.4
1058	1556	<i>cis</i> -sabinene hydrate	2.4
1086	1265	α -Terpinolene	1.8
1096	1474	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1.6
1128	1487	Campholenal	1.2
1138	1654	<i>trans</i> -Pinocarveol	3.5
1145	1532	Camphor	1.4
1152	1683	<i>trans</i> -Verbenol	1.0
1165	1587	Pinocarvone	2.5
1167	1719	Borneol	1.2
1176	1611	Terpinen-4-ol	6.9
1189	1706	α -Terpineole	2.4
1193	1648	Myrtenal	1.6
1196	1804	Myrtenol	1.7
1217	1725	Verbenone	1.3
1217	1845	Carveol	1.2
1355	-	α -Longipinene	1.6
1380	1669	β -Maaliene	2.6
1442	1716	Calarene	1.7
1477	1726	Germacrene D	1.8
1515	1776	γ -Cadinene	1.8
1524	1780	β -Sesquiphellandrene	1.8
1577	2008	Spathulenol	2.1
1580	2152	Caryophyllene oxide	1.5
1610	2090	β -Oplophenone	2.3
1640	2188	<i>T</i> -Cadinol	2.6
1651	2160	Santolinoidol (1)	7.1
Total identified			84.3

^a) Retention index on a DB-5MS column.

^b) Retention index on an HP Innnowax column.

The relative concentrations of the components were calculated based on the GC-FID peak areas without using correction factors.

1.4. Isolation of the new compound

A. santolinoides EO was fractioned by HPLC. Thirty seven contiguous 25 ml fractions were collected between 10 and 54 min and were gathered into 23 ones according to the HPLC

profile. These 23 fractions were analyzed by GC/MS. The unidentified component was the predominant constituent of fraction number 20, which was separated between ether (250 ml) and water (250 ml). The organic layer was then washed with water (3 × 50 ml), dried with MgSO₄, and evaporated without heating.

Santolinoidol. $[\alpha]_D^{25}$ -19.07 (c 0.08, CHCl₃); NMR spectral data, see Table 2; HRESITOFMS m/z 239.2011 $[M+H]^+$ (calcd for C₁₅H₂₇O₂, 239.2011).

1.5. Antimicrobial assay

Gram-negative bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* CIP 82118, Gram-positive bacterial strains *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *S. aureus* ATCC 33591 (Methicillin Resistant *S. aureus*), yeast *Candida albicans* ATCC 10231 and the clinical isolates of dermatophyte *Trichophyton rubrum* SNB-TR1, *T. mentagrophytes* SNB-TM1, *T. soudanense* SNB-TS1, *T. violaceum* SNB-TV1 and *T. tonsurans* SNB-TT1 were used in this study.⁶ The antimicrobial activity of the EOs was measured using a broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.⁷⁻¹¹ Briefly, the essential oil was diluted in DMSO and was tested at concentrations ranging from 512 to 16 µg/ml. The microplates were incubated at 37°C for 24 h for bacteria, 48 h for yeasts and 5 days for dermatophytes. Oxacillin, gentamicin and vancomycin (16 - 0.03 µg/ml) were used as reference antibiotics, while itraconazole (16 - 0.03 µg/ml) and fluconazole (64 - 0.125 µg/ml) were used as positive controls for the antifungal assays.

2. NMR spectra of santolinoidol (1, CDCl₃, purity 77%)

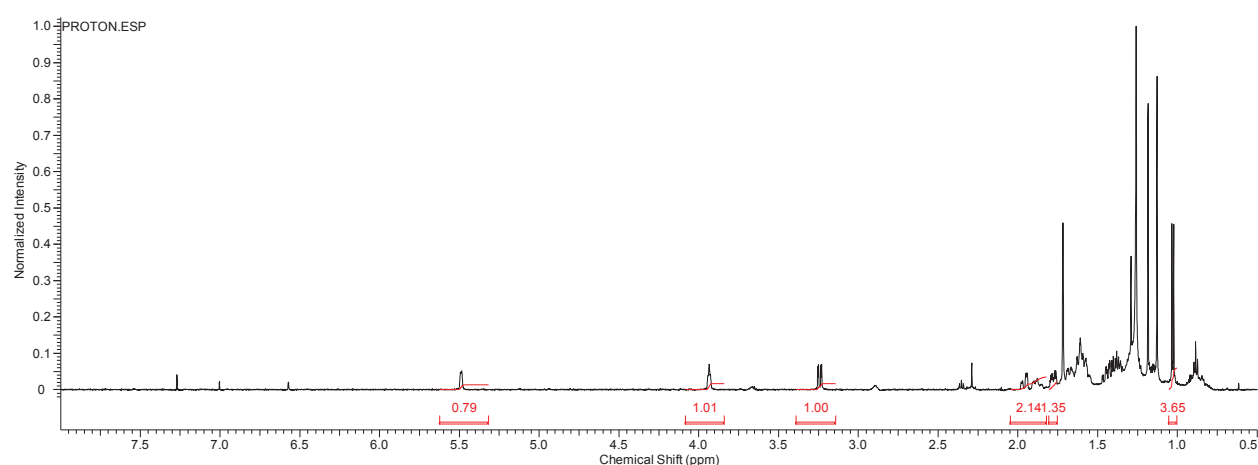


Figure S1: ¹H NMR spectrum (600 MHz)

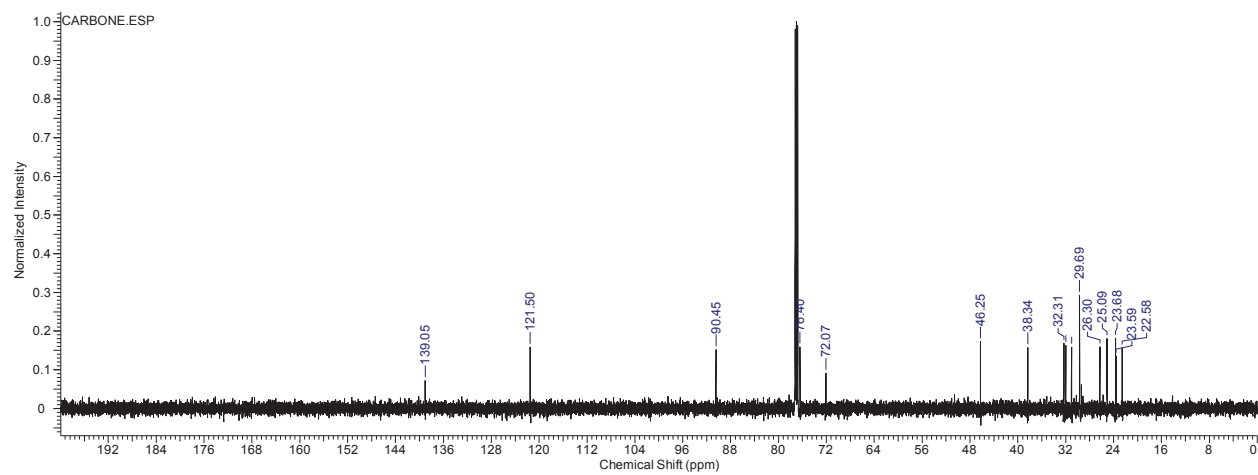


Figure S2: ^{13}C NMR spectrum (150.9 MHz)

Figure S3 : COSY spectrum

HSQC.ESP

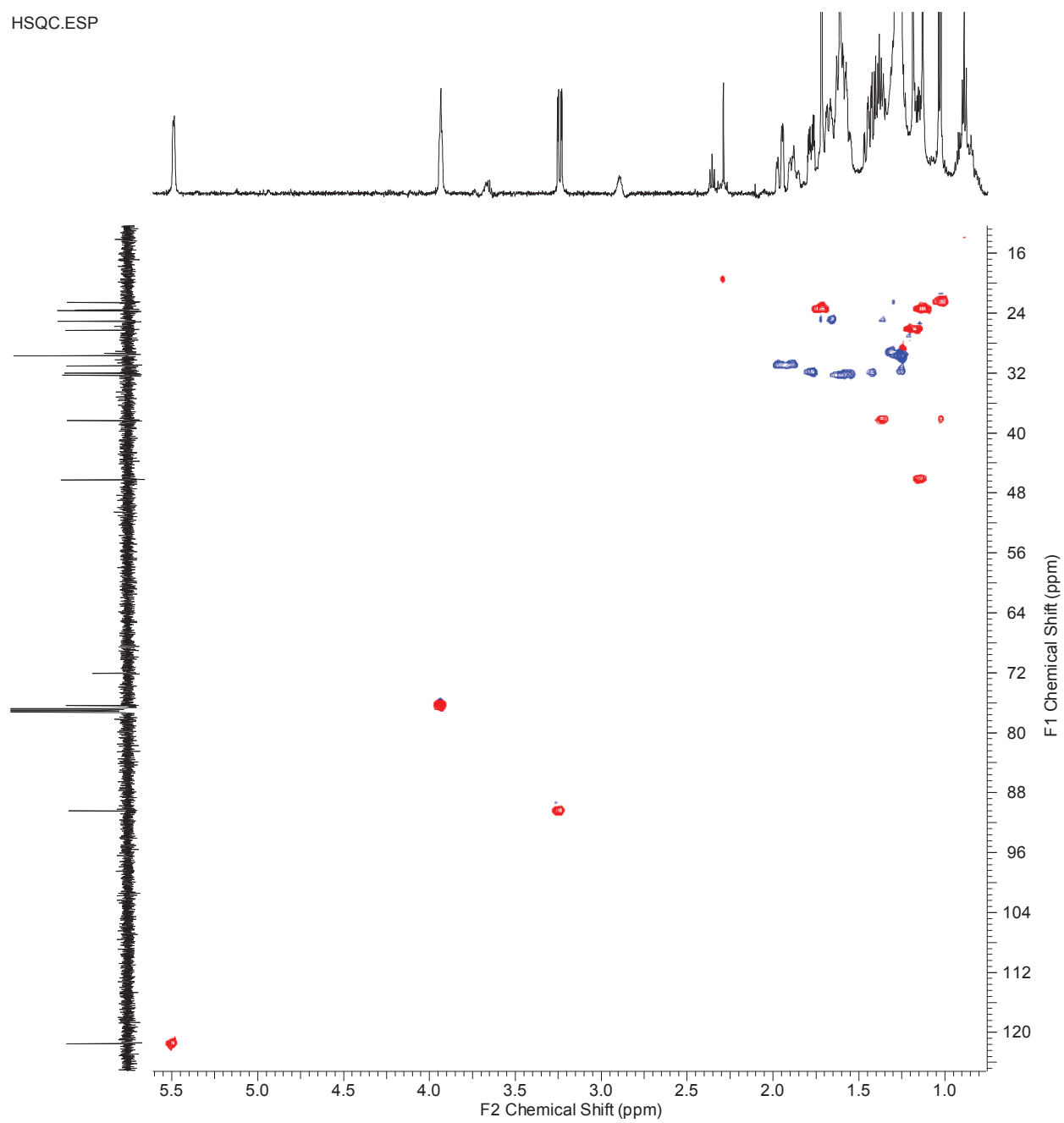


Figure S4 : HSQC spectrum

HMBC.ESP

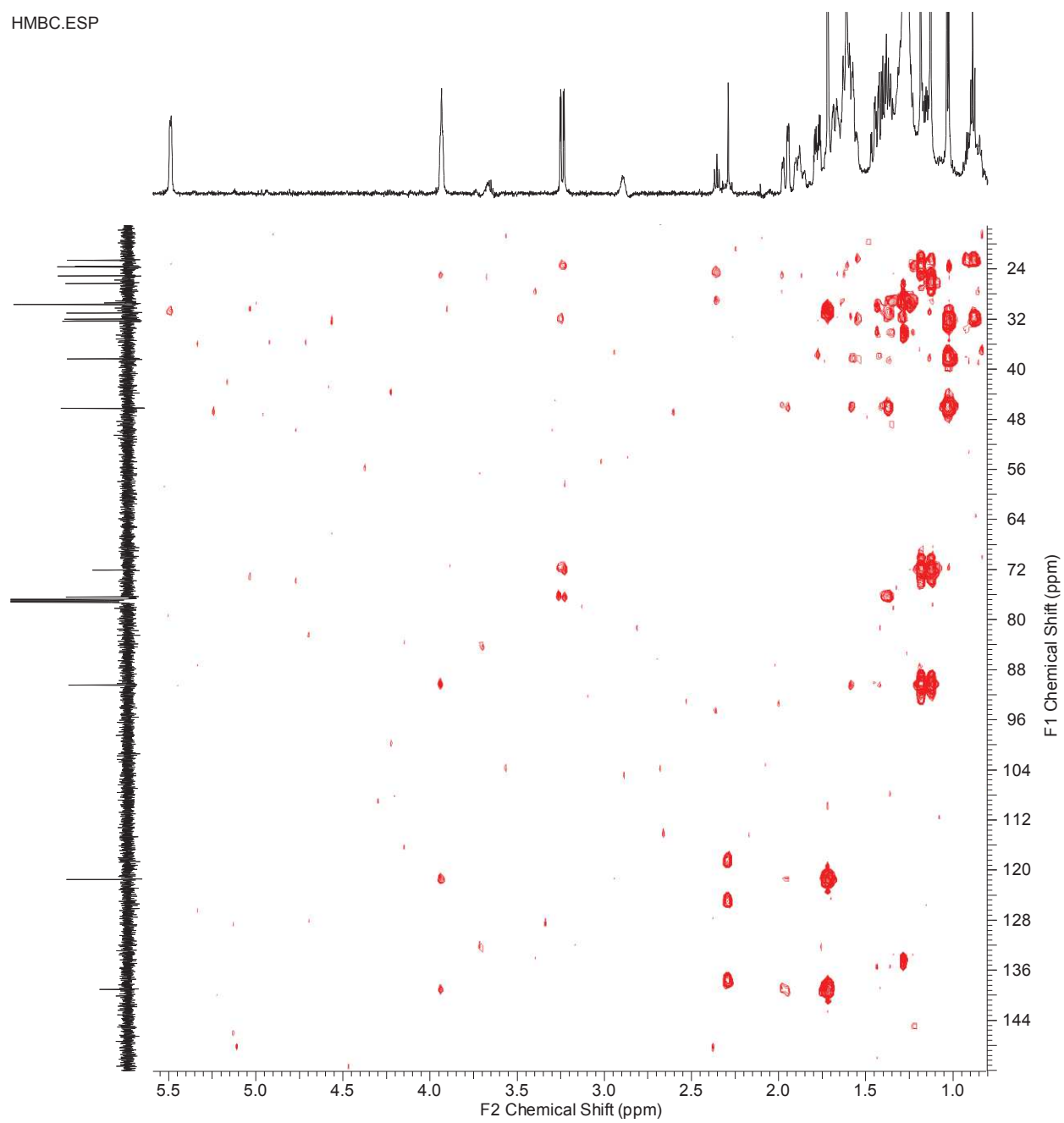


Figure S5 : HMBC spectrum

NOESY.ESP

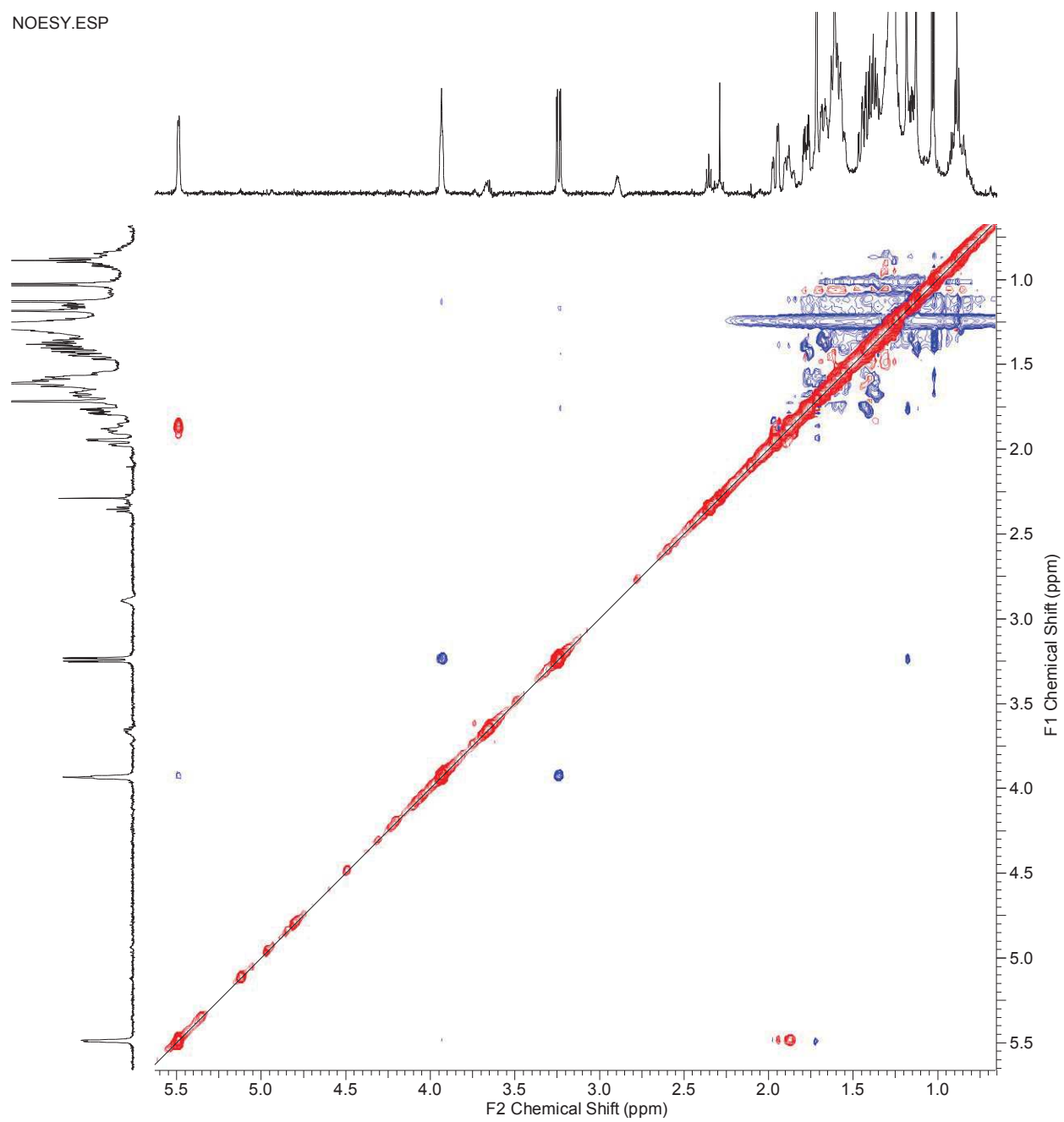


Figure S6 : NOESY spectrum

References

1. Mouterde, P. In *Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie*; Dar El-Marchreq: Beyrouth, 1966.
2. *European Pharmacopoeia-Third edition*; Council of Europe Publishing: Strasbourg, 1997.
3. Davies, N.W. *J. Chromatogr. A.* **1990**, 503, 1.
4. Jennings, W.; Shibamoto, T. In *Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography*; Academic Press: New York, 1980.
5. Adams, R. P. In *Identification of essential oil components by gas chromatography/Mass spectroscopy, 4th edition*; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 2007.
6. Nirma, C.; Eparvier, V.; Stien, D. *J. Nat. Prod.* **2015**, 78, 159.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. In *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard—Eight edition*; CLSI document M07-A8: Wayne, PA, 2009.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. In *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard—Second edition*; CLSI document M38-A2: Wayne, PA, 2008.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. In *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard—Third edition*; CLSI document M27-A3: Wayne, PA, 2008.
10. Khoury, M.; El-Beyrouthy, M.; Ouaini, N.; Iriti, M.; Eparvier, V.; Stien, D. *Chem. Biodivers.* **2014**, 11, 825.
11. Rodrigues, A. M. S.; Theodoro, P. N. E. T.; Basset, C.; Silva, M. R. R.; Beauchêne, J.; Espindola, L. S.; Stien, D. *J. Nat. Prod.* **2010**, 73, 1706.

4. ARTICLE 3 : L'activité antimicrobienne *in vitro* de l'huile essentielle d'*Hypericum scabrum*, d'un mélange reconstitué, et des combinaisons de l'huile avec des médicaments antifongiques

4.1. Contexte de l'étude

Dans le criblage initial, nous avons pu obtenir une huile essentielle possédant une activité antifongique intéressante à partir d'une espèce de millepertuis, *Hypericum scabrum* L. (Figure 20). *H. scabrum* est une plante glabre, dressée, de 50 à 100 cm de hauteur. Ses tiges et rameaux sont couverts de glandes fines, spinuleuses ou rougeâtres. Ses feuilles caulinaires ont à leur aisselle des fascicules ou de courts ramules plus développés sur les tiges stériles. Elle est caractérisée par des feuilles sessiles, oblongues-linéaires à linéaires, plus ou moins convolutées, surtout celles des fascicules, elles-mêmes assez densément couvertes de glandes saillantes, spinescentes et concolores. Elle possède des ponctuations translucides plus ou moins denses, une inflorescence en corymbe terminal compact et voyant et des bractées entières et membraneuses. Son calice est trois fois plus court que la corolle, et divisé jusqu'au tiers ou jusqu'au milieu en sépales ovés ou ovés oblongs, entiers ou frangés, glandulifères ou non. Sa capsule est acuminée, trois fois plus longue que le calice et à carpelles dispermes.⁵

L'usage phytothérapeutique du millepertuis perforé (*H. perforatum*) est largement documenté, et cette plante est enregistrée dans les pharmacopées de beaucoup de pays, notamment comme vulnéraire ou antidépresseur. Elle est même commercialisée comme médicament antidépresseur en Allemagne.

Pour toutes ces raisons, il a été jugé intéressant d'étudier plus avant l'origine de l'activité antifongique de l'HE d'*H. scabrum*, d'autant plus que cette huile a présenté une interaction synergique avec l'amphotéricine B.

L'analyse de l'huile et la recherche de l'origine de son activité antifongique font ainsi l'objet d'une proposition d'article qui sera soumis après la soutenance.



Figure 20 : *Hypericum scabrum* L.

4.2. Article

***In vitro* antimicrobial activity of *Hypericum scabrum* essential oil, a reconstructed mixture, and combinations of the oil with antifungal drugs**

by Laya Fahed^{a)b)}, Marc El Beyrouthy^{b)}, Naïm Ouaini^{b)}, Véronique Eparvier^{a)}, and Didier Stien^{*a)c)}

^{a)} UPR 2301, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 1 Avenue de la Terrasse, Gif-sur-Yvette, FR-91198 France (phone: +33-1-69823610, fax: +33-1-69823784, e-mail: didier.stien@cnrs.fr)

^{b)} Department of Agricultural Sciences, Holy Spirit University of Kaslik, Kaslik, Jounieh, B.P. 446 Lebanon

^{c)} Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Oceanologique, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Sorbonne Universités, Banyuls/Mer, FR-66650 France

Abstract

The chemical composition of Lebanese *Hypericum scabrum* essential oil was analysed by GC and GG-MS. Its antimicrobial activity was evaluated by determining its minimal inhibitory concentrations (MICs) against a Gram-negative and a Gram-positive bacteria, one yeast, and five dermatophytes. *H. scabrum* EO was most active on filamentous fungi (MIC values 32-64 µg/ml). Synergy within the oil was investigated by testing on *Trichophyton rubrum* each of the major components, α -pinene, limonene, myrcene, β -pinene and nonane, as well as a reconstructed EO. The antifungal activity of the natural oil could not be reached, meaning that its activity might be due in part to minor constituent(s). Interactions between *H. scabrum* EO and commercially available antifungals were assessed by the checkerboard test. A synergistic effect was revealed in the combination of the EO with amphotericin B.

Key words:

Hypericum scabrum, Essential oil, Chemical composition, Antimicrobial activity, Synergy.

Introduction

Antimicrobial resistance is jeopardizing public health and is thus turning into an urgent global concern. Resistance occurrence is the result of random genetic events such as mutations and horizontal gene transfers that enable microbial genomes to evolve¹, while its persistence and spread in the ecosystem is favored by selective pressure of antimicrobial agents.^{2,3}

One approach to avoid the emergence of resistant strains is combination therapy that consists in associating several antimicrobial agents. The chance of having mutants resistant to agents with independent mechanisms of action is extremely small. Resistance is thus less likely to develop.⁴ Such associations could also be used to improve the therapy efficiency when they result in synergistic effects. Another advantage of such combinations is that lower doses are used,⁵ reducing side effects and cost of the treatment.⁶ In this field, associations between plant essential oils and classic antimicrobials have proven their efficiency.^{7,8}

Plants belonging to the genus *Hypericum* are well-known for their therapeutic benefits. The most popular species is *Hypericum perforatum* (St John's Wort). Its extract is one of the best-selling herbal medicines in the world. It is used to treat mild to moderate depression.^{9,10,11}

Hypericum scabrum L. (Hypericaceae) has traditionally been, in different parts of the world, the basis of medical treatment of many ailments such as hemorrhoids,¹² body heat,¹³ stomachache, diarrhea,¹⁴ sun burn and skin lesion.¹⁵

So far, there have been no reports on *H. scabrum* from Lebanon whatsoever. In other countries, extracts and essential oils of *H. scabrum* have been described as having interesting anticonvulsant¹⁶, antihypoxic, antidepressant,¹⁷ antioxidant and antimicrobial^{18,19} activities. It was therefore interesting to investigate the chemical composition of its essential oil and to evaluate its antimicrobial activity alone and in combination with conventional antimicrobials.

Results and Discussion

Chemical Analysis. Hydrodistillation of *H. scabrum* aerial parts yielded 0.6% essential oil. Thirty-seven compounds representing 84.2% of the whole oil were identified (Table 1).

α -Pinene was the most abundant compound (37.8%), followed by limonene (11.6%), myrcene (5.6%), β -pinene (3.4%), and nonane (3%). It is noteworthy that α -pinene was also the major compound of the previously studied *H. scabrum* essential oils from different regions of the world like Iran²⁰, Turkey²¹, Tajikistan²² and Uzbekistan²³. This doesn't apply to the other major compounds which were sometimes minorly present or even totally absent in these other samples.

Table 1: Chemical Composition of *Hypericum scabrum* essential oil

RI ^a	RI ^b	Compounds	(%)
901	-	Nonane	3.0
938	1076	α -Pinene	37.8
980	1118	β -Pinene	3.4
993	1174	Myrcene	5.6
1030	1203	Limonene	11.6
1045	1269	<i>cis</i> - β -Ocimene	1.1
1050	1253	<i>trans</i> - β -Ocimene	0.9
1100	1490	Undecane	1.6
1134	1493	<i>allo</i> -Ocimene	1.7
1138	1664	Pinocarveol	0.1
1152	1683	<i>trans</i> -Verbenol	0.2
1168	1697	α -Phellandren-8-ol	0.1
1189	1706	α -Terpineol	0.1
1196	1804	Myrtenol	0.1
1352	1466	α -Cubebene	0.1
1377	1497	α -Copaene	0.3
1385	1533	β -Bourbonene	0.1
1415	1612	<i>trans</i> -Caryophyllene	1.3
1437	1628	Aromadendrene	0.3
1439	1650	α -Guaiene	0.3
1455	1689	<i>trans</i> - β -Farnesene	2.0
1477	1726	Germacrene D	1.3
1485	1711	β -Selinene	0.4
1495	1740	Valencene	1.2
1500	1740	α -Muurolene	0.4
1515	1776	γ -Cadinene	0.7
1525	1772	δ -Cadinene	1.3
1526	1773	α -Cadinene	0.2
1541	1918	α -Calacorene	0.2
1566	2050	Nerolidol	0.4
1577	2008	Spathulenol	2.7
1585	2098	Globulol	0.5
1591	2104	Viridiflorol	0.3
1640	2188	<i>T</i> -Cadinol	0.9
1645	2145	Torreyol	0.3
1649	2188	α -Eudesmol	0.2
1650	2256	α -Cadinol	1.4
Total identified			84.2

^a) Retention index on a DB-5MS column.

^b) Retention index on an HP Innowax column

Antimicrobial activity. The results of antimicrobial activity of *H. scabrum* EO are presented in Table 2. EOs with minimal inhibitory concentrations (MICs) of 128 μ g/ml and below are generally considered active.^{24,25}

The oil was inactive on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (MIC > 512 μ g/ml). Conversely, *H. scabrum* EO presented significant antifungal activity against

filamentous dermatophytic fungi (MIC values 32-64 µg/ml) whereas *Candida albicans* was weakly sensitive (MIC 512 µg/ml).

Table 2: Antimicrobial activity (MIC in µg/ml) of *Hypericum. scabrum* EO

<i>Pathogens</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>P. aeruginosa</i> CIP 82118	<i>T. rubrum</i> SNB-TR1	<i>T. mentagrophytes</i> SNB-TM1	<i>T. soudanense</i> SNB-TS1	<i>T. violaceum</i> SNB-TV1	<i>T. tonsurans</i> SNB-TT1
<i>H. scabrum</i> EO	> 512	512	> 512	64	32	32	32	64
Reference compounds	1 ^a	1 ^b	0.25 ^c	2 ^b	1 ^d	2 ^b	2 ^b	4 ^b

^a Oxacillin; ^b Fluconazole; ^c Gentamicin; ^d Itraconazole

In an attempt to shed light on the origin of the antifungal activity, we undertook to test individually the major components and a reconstructed EO against *Trichophyton rubrum* (Table 3). The artificial EO was prepared using the major compounds in pure form, in the same proportions as in the EO, whereas the minor ones were replaced by DMSO (38.6%).

α -Pinene, limonene, myrcene, β -pinene and nonane showed no significant activity (MIC 512 µg/ml). The reconstructed EO exhibited a moderate activity (256 µg/ml) which points to a probable synergy between the major compounds. It is however less active than the natural EO (64 µg/ml) indicating that minor constituents contribute to the overall activity of the EO.

Table 3: Antifungal activity (MIC in µg/ml) of the major constituents of *Hypericum scabrum* EO and a reconstructed EO from the major constituents on *Trichophyton rubrum*

	Nonane	α -Pinene	β -Pinene	Myrcene	Limonene	Reconstructed EO (61.4%)
<i>T. rubrum</i> SNB-TR1	512	512	512	512	512	256

The interaction between *H. scabrum* and antifungal drugs was tested by the checkerboard assay on *T. rubrum*, and results are given in Table 4. A synergistic effect (FICI 0.5) was observed by combining the EO with amphotericin B. When the EO was added at a concentration of 32 µg/ml, the MIC of amphotericin B was lowered from 4 to 0.125 µg/ml. In the other hand, associations with fluconazole and griseofulvin were moderately synergistic (FICI 0.6).

Table 4: Combined effects of *Hypericum scabrum* essential oil and conventional antimicrobial drugs on *Trichophyton rubrum*

	Combination	EO:Fluconazole	EO:Griseofulvin	EO:Amphotericin B
EO	MIC _a	64	64	64
	MIC _c	32	32	32
	FIC	0.5	0.5	0.5
Drug	MIC _a	2	1	4
	MIC _c	0.25	0.0625	0.125
	FIC	0.125	0.0625	0.03
	FICI	0.6	0.6	0.5

MIC_a: MIC of the EO or the drug alone (in µg/ml); MIC_c: MIC of the EO or the drug at the relative proportion displaying the highest synergy (in µg/ml); FIC: Fractional Inhibitory Concentration; FICI: FIC Index

Conclusions

Our results showed that *H. scabrum* EO exhibited interesting antifungal activity. This activity could not be attributed to one major constituent of the oil. It clearly resulted from the interaction of several constituents including minor ones. In addition, its synergistic interaction with amphotericine B, and the moderately synergistic association with fluconazole and griseofulvin suggested that combinations between this EO and conventional antifungal agents may lead to new more potent formulations with less dose-related toxicity.

Acknowledgments

This work benefitted from an "Investissement d'Avenir" grant managed by the Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01) and from the support of CNRS Lebanon.

Experimental Part

Plant Material. Aerial parts were collected in June 2013 from Mzaar Kferdebian, Mount Lebanon (33°59'38" N 35°50'5" E) at an altitude of 1818 m. The plant identification was based on 'Nouvelle flore du Liban et de la Syrie' by Paul Mouterde.²⁶ Air drying of the plant materiel was performed in a shady place for two weeks at room temperature.

Essential Oil Extraction. The extraction of the essential oil was carried out by hydrodistillation for three hours using a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia, 1997.²⁷

GC Analyses. Analytical gas chromatography was performed on a Thermo Electron Corporation gas chromatograph fitted with a flame ionization detector (FID), a DB-5 MS

capillary column (30 m × 0.25 mm) with 0.1 µm film thickness or a fused silica HP Innowax polyethylene glycol capillary column (50 m × 0.20 mm, film thickness 0.20 µm). Helium was the carrier gas (0.7 ml/min). The column temperature was initially set to 35 °C before being gradually increased to 85 °C at 5 °C/min, held for 20 min at 85 °C, raised to 300 °C at 10 °C/min and finally held for 5 min at 300 °C. Diluted 1 µl samples (1/100, v/v) were injected at 250 °C manually and in the splitless mode. Flame ionisation detection (FID) was performed at 310 °C.

GC–MS Analyses. The GC/MS analyses were performed using an Agilent 6890 gas chromatograph coupled with 5975 Mass Detector. The 7683 B auto sampler injected 1 µL of each diluted oil sample (1/100, v/v). A fused silica capillary column DB-5 MS (30 m × 0.25 mm internal diameter, film thickness 0.1 µm) or a fused silica HP Innowax polyethylene glycol capillary column (50 m × 0.20 mm, film thickness 0.20 µm) was used. Helium was the carrier gas (0.7 ml/min). The oven temperature program was identical to that described above (cf. GC Analysis). The mass spectra were recorded at 70 eV with an ion source temperature of 310 °C and a transfer line heated to 320 °C. The acquisition was recorded in full scan mode (50 – 400 amu).

Qualitative and Quantitative Analysis. Most constituents were identified by gas chromatography by comparing their retention indices (RI) with those from the literature^{28,29} or with those of authentic compounds obtained from Sigma-Aldrich (Lebanon and France). The retention indices were determined relatively to a homologous series of *n*-alkanes (C8 to C24) analysed under the same operating conditions. Concomitantly, their mass spectra on both columns were compared with those provided in the NIST and Wiley 275 libraries, our home-made library constructed with pure compounds and EOs of known composition or with mass spectra from the literature.^{28,30} The relative concentration of each component was calculated based on the GC peak areas without using correction factors.

Antimicrobial activity. Gram (–) bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* CIP 82118, Gram (+) bacterial strain *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, yeast *Candida albicans* ATCC 10231 and the clinical isolates of dermatophyte *Trichophyton rubrum* SNB-TR1, *Trichophyton mentagrophytes* SNB-TM1, *Trichophyton soudanense* SNB-TS1, *Trichophyton violaceum* SNB-TV1 and *Trichophyton tonsurans* SNB-TT1³¹ were used in this study.

The antimicrobial activity of the EOs was measured using a broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.^{32,36} The essential oils and its major components were diluted in DMSO and were tested at concentrations ranging from 512 to 16 µg/ml. The microplates were incubated at 37°C for 24 h for bacteria, 48 h for yeasts and 5 days for dermatophytes. The minimal inhibitory concentrations (MIC) refer to the lowest concentrations preventing visible microbial growth (Table 2, Table 3). Oxacillin, and gentamicin (16 - 0.03 µg/ml) were used as reference antibiotics, while itraconazole (16 - 0.03 µg/ml) and fluconazole (64 – 0.125 µg/ml) were used as positive controls for the antifungal assays. The antimicrobial standards were purchased from Molekula – Dorset, UK and the pure terpenes from Sigma-Aldrich, France.

Synergy test by Microdilution Checkerboard technique. This test is performed in a 96-well microplate and is based on the microdilution method. In particular, two fold dilution series of the essential oil are made in the vertical direction on the plate while that of the antimicrobial agent are made in the horizontal direction of the same plate in order to have in each row and column a fixed amount of the first agent and a decreasing amount of the second one.^{37,38} The essential oil was tested at concentrations ranging from 256 to 8 µg/ml. Antimicrobial agents were tested at concentrations ranging from 16 to 0.03 for griseofulvin and amphotericin B, and from 64 to 0.125 for fluconazole.

A quantitative assessment of the interactions was based on the calculation of fractional inhibitory concentrations (FICs) defined as the ratio of the MIC of the combinations of the two components to the MIC of the essential oil or the drug alone, and the FIC index (FICI) which is the sum of the two FICs. The results were interpreted as follows: $FICI \leq 0.5$, synergistic effect; > 0.5 and ≤ 2.0 , additive effect > 2 , antagonistic effect as proposed by Shin and Lim (2004).³⁹

References

1. Dobnndt, U., Hentschel, U., Kaper, J.B., Hacker J., 2002. Genome plasticity in pathogenic and nonpathogenic enterobactetia. *Current topics in Microbiology and Immunology* 264, 157–75.
2. Duval-Iflah, Y., Rmbaud, P., Tancrede, C., Rousseau, M., 1980. R-plasmid transfer from *Serratia liquefaciens* to *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo* in the digestive tract of gnotobiotic mice associated with human fecal flora. *Infection and Immunity* 28, 981–990.
3. Andremont, A., 2005. Comment définir le potentiel de selection de la résistance bactérienne aux antibiotiques ? *Médecine et maladies infectieuses* 35, 207–211.
4. Fischbach, M.A., 2011. Combination therapies for combating antimicrobial resistance. *Current opinion in microbiology* 14, 519–523.
5. Williamson, E.M., 2001. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 8, 401–409.
6. Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N.E., Pagès, J.M., Hassani, L., 2012. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 19, 464–71.
7. Mahboubi, M., Bidgoli, F.G., 2010. *In vitro* synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. *Phytomedicine* 17, 771–774.
8. Rosato A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., Milillo, M., 2007. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine* 14, 727–732.
9. Cavaliere, C., Rea, P., Lynch, M.D., Blumenthal, M., 2009. Herbal supplement sales experience slight increase in 2008. *HerbalGram* 82, 58–61.

10. Bäcker, W., Bart, H.J., Bischoff, F., Grabley, S., Goedecke, R., Johannisbauer, W., Jordan, V., Stockfleth, R., Strube, J., Wiesmet, V., 2006. Phytoextrakte - Produkte und Prozesse. http://www.dechema.de/dechema_media/Downloads/Extraktion/Phytoextrakte.pdf
11. Gambarana, C., Tolu, P.L., Masi, F., Rinaldi, M., Giachetti, D., Morazzoni, P., De Montis, M.G., 2001. A study of the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* on animal models. *Pharmacopsychiatry* 34, 42–44.
12. Cakilcioglu, U., Turkoglu, I., 2010. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* 132, 165–175.
13. Sadegh Amiri, M., Jabbarzadeh, P., Akhondi, M., 2012. An ethnobotanical survey of medicinal plants used by indigenous people in Zangelanlo district, Northeast Iran. *Journal of Medicinal Plants Research* 6, 749–753.
14. Sezik, E., Yesilada, E., Shadidoyatov, H., Kulivey, Z., Nigmatullaev, A.M., Aripov, H.N., Takaishi, Y., Takeda, Y., Honda, G., 2004. Folk medicine in Uzbekistan: I. Toshkent, Djizzax, and Samarqand provinces. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 197–207.
15. Fakir, H., Korkmaz, M., Güller, B., 2009. Medicinal Plant Diversity of Western Mediterranean Region in Turkey. *Journal of Applied Biological Sciences* 3, 3–4.
16. Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Ahangar, N., 2013. Anticonvulsant activity of *Hypericum scabrum* L.; possible mechanism involved. *European Review for Medical and Pharmacological Science* 17, 2141–2144.
17. Eslami, B., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Ebrahimzadeh, M.A., Mahmoudi, M., 2011. Pharmacological activities of *Hypericum scabrum* L. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 15, 532–537.
18. Unal, E.L., Mavi, A., Kara, A.A., Cakir, A., Şengül, M., Yildirim, A., 2008. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Some Plants Used as Remedies in Turkish Traditional Medicine. *Pharmaceutical Biology* 46, 207–224.

19. Akhbari, M., Batooli, H., Mozdianfard, M., 2012. Comparative study of composition and biological activities of SDE prepared essential oils from flowers and fruits of two *Hypericum* species from central Iran. *Natural Product Research* 26, 193–202.
20. Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Changizi, S., 2006. The essential oil composition of *Hypericum scabrum* L. from Iran. *Flavour and Fragrance Journal* 21, 513–515.
21. Çakir, A., Duru, M. E., Harmandar, M., Ciriminna, R., Passannanti, S., Piozzi, F., 1997. Comparison of the Volatile Oils of *Hypericum scabrum* L. and *Hypericum perforatum* L. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 12, 285–287.
22. Sharopov, F., Gulmurodov, I., Setzer, W., 2010. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum scabrum* L. growing wild in Tajikistan. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2, 284–290.
23. Baser, K.H.C., Ozek, T., Nuriddinov, H.R., Demirci, A.B., 2002. Essential oils of two *Hypericum* species from Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds* 38, 55–57.
24. Ríos, J.L., Recio, M.C., 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 80–84.
25. Fahed, L., Stien, D., Ouaini, N., Eparvier, V., El Beyrouthy M., 2016. Chemical diversity and antimicrobial activity of the essential oils of *Salvia multicaulis* Vahl. *Chemistry & Biodiversity* 13, 591–595.
26. Mouterde, P., 1970. *Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie*, Tome III, Dar El-Marchreq, Beyrouth.
27. *European Pharmacopoeia*, 1997. Council of Europe, Strasbourg. 3rd Ed., 1–1799.
28. Jennings, W., Shibamoto, T., 1980. Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. Academic Press, New York.
29. Davies, N.W., 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A* 503, 1–24.

30. Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/Mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
31. Nirma, C., Eparvier, V., Stien, D., 2015. Antibacterial Illicolonic Acids C and D and Illicolinal from *Neonectria discophora* SNB-CN63 Isolated from a Termite Nest. *Journal of Natural Products* 78, 159–162.
32. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009. Reference methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved Guideline; Document M26-A, CLSI, Wayne, PA, USA.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard, 2nd ed. Document M38-A2, CLSI, Wayne, PA, USA.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard, 3rd ed. Document M27-A3, CLSI, Wayne, PA, USA.
35. Khoury, M., El-Beyrouthy, M., Ouaini, N., Iriti, M., Eparvier, V., Stien, D., 2014, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Juniperus excelsa* M. Bieb. growing wild in Lebanon. *Chemistry & Biodiversity* 11, 825–830.
36. Rodrigues, A.M.S., Theodoro, P.N.E.T., Basset, C., Silva, M.R.R., Beauchêne, J., Espindola, L.S., Stien, D., 2010. Search for antifungal compounds from the wood of durable tropical trees. *Journal of Natural Products* 73, 1706–1707.
37. Vinks, A., Derendorf, H., Mouton, J., 2013. Fundamentals of Antimicrobial Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Springer, New York.
38. Houël, E., Rodrigues, A.M.S., Jahn-Oyac, A., Bessière, J.-M., Eparvier, V., Deharo, E., Stien, D., 2013. *In vitro* antidermatophytic activity of *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse essential oil alone and in combination with azoles. *Journal of Applied Microbiology* 116, 288–294.

39. Shin, S., Lim, S., 2004. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1289–1296.

5. ARTICLE 4 : La composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de six conifères récoltés au Liban

5.1. Contexte de l'étude

Aux conifères appartiennent différentes familles de plantes telles que les Cupressaceae et les Pinaceae. Ils sont caractérisés par leurs fruits appelés cônes. La grande majorité des conifères sont des arbres à feuilles persistantes. Ils sont particulièrement abondants dans l'hémisphère nord et constituent une des plus importantes ressources mondiales en bois de construction.

Au Liban, les peuplements purs et mixtes de conifères constituent à peu près la moitié de la superficie forestière totale estimée à 70 000 ha.¹⁸⁴ Ils sont représentés par dix espèces, *Abies cilicica* ou sapin de cilice, une espèce quasi-menacée,¹⁸⁵ *Cedrus libani* ou cèdre du Liban, *Cupressus sempervirens* ou cyprès méditerranéen, *Pinus brutia* ou pin calabrais, *Pinus halepensis* ou pin d'Alep, *Pinus pinea* ou pin de pierre, *Juniperus drupacea* ou genévrier de Syrie, *Juniperus excelsa* ou genévrier grec, *Juniperus oxycedrus* ou genévrier épineux et *Juniperus foetidissima*.¹⁸⁶

Les résultats de l'analyse de la composition chimique et de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'un conifère introduit au Liban, *Cupressus macrocarpa*, et de cinq conifères indigènes dont trois ont fait, dans les mêmes conditions expérimentales, l'objet d'une étude précédente dans le cadre de la thèse d'une collègue Madona Khoury,^{187,188} ont été regroupés dans le manuscrit ci-après, qui a été accepté pour publication dans *Chemistry and Biodiversity*.

¹⁸⁴ Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1993. Assistance au reboisement. Programme de Coopération FAO/Liban.

¹⁸⁵ Gardner, M., Knees, S., 2013. IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/search>

¹⁸⁶ Talhouk, S.N., Zurayk, R., Khuri, S., 2001. Conservation of the coniferous forests of Lebanon: past, present and future prospects. *Oryx* 35, 206–215.

¹⁸⁷ Khoury, M., 2015. Thèse de doctorat. Muséum national d'histoire naturelle, France.

¹⁸⁸ Khoury, M., El Beyrouthy, M., Ouaini, N., Iriti, M., Eparvier, V., Stien, D., 2014. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Juniperus excelsa* M.Bieb. growing wild in Lebanon. *Chemistry and Biodiversity* 11, 825–830.

5.2. Article

Essential oils composition and antimicrobial activity of six conifers harvested in Lebanon

by Loyal Fahed^{a)b)}, Madona Khoury^{a)b)}, Didier Stien^{*a)c)}, Naïm Ouaini^{b)},
Véronique Eparvier^{a)}, and Marc El Beyrouthy^{b)}

^{a)} UPR 2301, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 1 Avenue de la Terrasse, Gif-sur-Yvette, FR-91198 France (phone: +33-1-69823610, fax: +33-1-69823784, e-mail: didier.stien@cnrs.fr)

^{b)} Department of Agricultural Sciences, Holy Spirit University of Kaslik, Kaslik, Jounieh, B.P. 446 Lebanon

^{c)} Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Sorbonne Universités, Banyuls/Mer, FR-66650 France

Abstract

The chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils (EOs) of six conifers harvested in Lebanon, *Abies cilicica*, *Cupressus sempervirens*, *Juniperus excelsa*, *Juniperus oxycedrus*, *Cedrus libani* and *Cupressus macrocarpa* gold crest, were investigated. The EOs were obtained by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus and characterized by GC and GC-MS analyses. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of these essentials oils were determined against a range of bacteria and fungi responsible for cutaneous infections in human, using the broth microdilution technique. The EOs showed the most interesting bioactivity on the dermatophytes species (MIC values 32-64 µg/ml). Each of the major compounds of *C. macrocarpa* as well as an artificial reconstructed EO were tested on *Trichophyton rubrum* showing a contribution of the minor components to the overall activity.

Keywords:

Chemical composition, Antimicrobial activity, Essential oils, Conifers, Lebanon

Introduction

Conifers are woody plants with most of them being evergreen trees. About 630 species of conifers can be found as wild populations in all continents except Antarctica [1]. In Lebanon they are represented by ten species belonging to five genera [2]. *Cedrus libani* A.Rich. , the national emblem of Lebanon, was mentioned in the Old Testament of the Holy Bible over 75 times and in the Epic of Gilgamesh, the oldest recorded legend [1]. Its wood was intensively exploited by ancient civilizations in the building of temples, palaces, and boats [3], and its essential oil was used by the Egyptians in the mummification process [4]. Lebanese conifer species are an important part of the folk medicine systems. *Abies cilicica* (Antoine & Kotschy) Carrière a plant endemic to Lebanon, Syria and asiatic Turkey is traditionally used in Lebanon for the treatment of rheumatism and lumbago, and is used in Turkey against gastrointestinal diseases, asthma and bronchitis [5] [6]. *Cupressus sempervirens* L. f. *horizontalis* (Mill.) Voss is known as an antiasthmatic, antitussive, antidontalgic, antiulcer and antirheumatic herbal remedy, while *Juniperus* species *J. excelsa* M. Bieb. and *J. oxycedrus* L. are prized for their antirheumatic and antineuralgic properties [7]. Beside indigenous species, many conifers are introduced in Lebanon generally for ornamental purposes. This is the case of *Cupressus macrocarpa* goldcrest, a plant used popularly in interior landscaping due to its bright color and agreeable lemon fragrance.

Antimicrobial resistance is a global concern requiring urgent actions across all concerned sectors. This phenomenon is accelerated by the excessive and inappropriate use of antimicrobial agents [8].

In an attempt to search for alternatives to conventional antibiotics and antifungals for the treatment of topical, non severe infections, the essential oils of the six above-mentioned conifer species were subjected to chemical analysis and evaluation of their antimicrobial activity.

Results and Discussion

Chemical Analysis. The chemical compositions of the six conifers essential oils are presented in Table 1. The yields of the EOs obtained by hydrodistillation ranged from 0.08%

(*J. oxycedrus*) to 1.1% (*J. excelsa*). GC and GC-MS analyses led to the identification of 91 components accounting for 81.6% (*A. cilicica*) to 94.3% (*C. macrocarpa*) of the oils.

Table 1: Chemical composition of six conifers essential oils

Compounds	Compounds (%)							
	RI ^a	RI ^b	<i>Abies cilicica</i>	<i>Cedrus libani</i>	<i>Cupressus macrocarpa</i> Gold crest	<i>Cupressus sempervirens</i>	<i>Juniperus excelsa</i>	<i>Juniperus oxycedrus</i>
Santene	889	1001	1.5					
Tricyclene	925	1030	0.7			0.2		
α -Thujene	929	1035			1.0			
α -Pinene	938	1076	8.5	39.7	1.6	57.5	38.9	44.7
Camphene	953	1076	7.4	0.5	0.2		0.7	0.1
Sabinene	973	1132		0.2	24.9	0.5	0.1	
β -Pinene	980	1118	2.1	14.7		3.0	0.5	2.4
Myrcene	993	1174	0.9	1.4	2.4	2.4	0.3	0.5
α -Phellandrene	1005	1188	0.7	0.1	0.4			
δ -3-Carene	1013	1159	14.5	0.1			4.2	0.2
α -Terpinene	1013	1188			3.8	0.3		
<i>p</i> -Cymene	1025	1280	0.6	0.3	1.3		0.4	0.1
Sylvestrene	1027	1176			2.4			
Limonene	1030	1203		1.3		3.7	0.9	2.6
β -Phellandrene	1033	1218	3.4					
cis- β -ocimene	1045	1269				0.2		
γ -Terpinene	1057	1255	0.8	0.1	6.5	0.4	0.1	
cis-Sabinene hydrate	1058	1556			0.7			
α -Fenchone	1079	1401		0.1				
Terpinolene	1086	1265	1.4	0.2	2.4	1.7	0.6	0.3
trans-Sabinene hydrate	1096	1474			0.4			
Linalool	1098	1553	0.7		1.9	0.8		0.1
cis- <i>p</i> -Mentha-2-en-1-ol	1117	-		0.1	0.9			
α -Campholenal	1128	1487					0.7	0.9
trans-Pinocarveol	1138	1664		0.4			0.6	1.9
trans- <i>p</i> -Mentha-2-en-1-ol	1139	-			0.4			
Camphor	1145	1532			3.1		0.5	
trans-Verbenol	1152	1683					1.1	
Citronellal	1155	1486			4.9			
Pinocarvone	1163	1587					0.1	
Borneol	1167	1719	0.5	0.2			0.1	1.4
Terpinen-4-ol	1176	1611	0.8	0.3	20.7	1.4		0.8
<i>p</i> -Cymen-8-ol	1182	1864		0.1			0.2	0.4
α -Terpineole	1189	1706	0.6	1.4	1.6	0.6		3.1
cis-Piperitol	1192	1674			0.2			
Myrtenal	1193	1648		0.2				0.2
Myrtenol	1196	1804		0.2				0.1
trans-Verbenone	1217	1725		0.3			0.3	0.6
trans-Piperitol	1217	1741			0.3			

<i>trans</i> -Carveol	1218	1845		0.2			0.3	0.5
Citronellol	1220	1772			10.3			
Myrtenyl acetate	1227	1698		0.1				
Carvone	1241	1752						0.3
Linalyl acetate	1259	1665	0.7					
Bornyl acetate	1285	1597	4.4	0.1		0.3	0.1	1.6
2-Undecanone	1298	1585			0.2			
Carvacrol	1299	2239						0.3
Citronellic acid	1312	-			0.5			
α -Terpinyl acetate	1333	1709	0.8			3.0		
α -Cubebene	1352	1466		0.1				4.5
α -Longipinene	1355	-	3.0					
Longicyclene	1368	-	0.8					
Ylangene	1372	1493	0.6					
α -Copaene	1377	1497		0.5				1.3
Neryl acetate	1379	1760		0.3				
Longifolene	1407	1574	2.4					
Cedrene	1411	1568		0.3			1.4	
β -Caryophyllene	1415	1612	5.6	0.2		0.6		1.1
Himachala-2,4-diene	1434	-	6.3					
<i>trans</i> - α -Bergamotene	1436	1573					0.1	
α -Himachalene	1447	1648	0.9					
α -Humulene	1452	1668	2.0	0.2		0.4		0.4
β -Farnesene	1455	1689	0.8	0.5				1.4
Germacrene D	1477	1726				0.7	0.2	3.5
γ -Muurolene	1478	1704		0.2				
α -Curcumene	1483	1784						1.4
10s,11s-Himachala-3(12), 4-diene	1486	-	2.5					
β -Himachalene	1499	-	1.6					
α -Muurolene	1500	1740		0.1				
β -Bisabolene	1508	1741	0.7					
α -Bisabolene	1510	1778		1.4				
γ -Cadinene	1515	1776		0.1				1
δ -Cadinene	1525	1772		0.3		0.3	0.1	1.7
α -Calacorene	1541	1918	0.6					
Nerolidol	1566	2050	0.7					1.6
Caryophyllene oxide	1580	2152	0.6	0.1				1.9
Viridiflorol	1591	2104					1.9	
Longiborneol	1597	2100	0.6					
α -Cedrol	1599	2120				4.5	35.7	
<i>epi</i> -Globulol	1629	2025				0.3		
<i>T</i> -cadinol	1640	2188				0.3		5.5
Himachalol	1648	2247	0.9					
α -Cadinol	1650	2256				1.3		
8-Cedren-13-ol	1702	2323		0.2				
Farnesol	1724	1946			0.9			
Tetradecanoic acid	1768	2672						0.3
Phytol	1950	2603						0.2

Isophyllocladene	1967	-		0.4			
Sclarene	1974	2408	5.7				
Abieta-8,11,13-triene	2055	-	7.5				
Abieta-7,13-diene	2083	-	9.4				
Total identified			81.6	89.4	94.3	84.4	90.1

Bold numbers indicate the percentages higher than 3% to show main components

^{a)} Retention index on a DB-5MS column.

^{b)} Retention index on an HP Innnowax column

The data matrix was used to generate a biplot superimposing principal component analysis (vectors) with a map of the variables (i.e. molecules) (Figure 1). Loading factors 1 and 2 in PCA described 77.5% of the variability in the dataset. It can be seen that 4 out of 6 EOs clustered in one chemical group, with a high relative proportion of α -pinene and a lower proportion of β -pinene. Two outliers are present in the dataset, *A. cilicica* and *C. macrocarpa* EOs. *A. cilicica* EO contains a significant amount of α -pinene (8.5%) and is therefore not orthogonal to the group of α -pinene rich oils. What makes it peculiar in this dataset is the high proportion of δ -3-carene, as indicated by the biplot. As regards *C. macrocarpa* EO, it is orthogonal to the others and its specific descriptors are sabinene, terpinen-4-ol and citronellol. These compounds are either absent or minorly present in the other EOs.

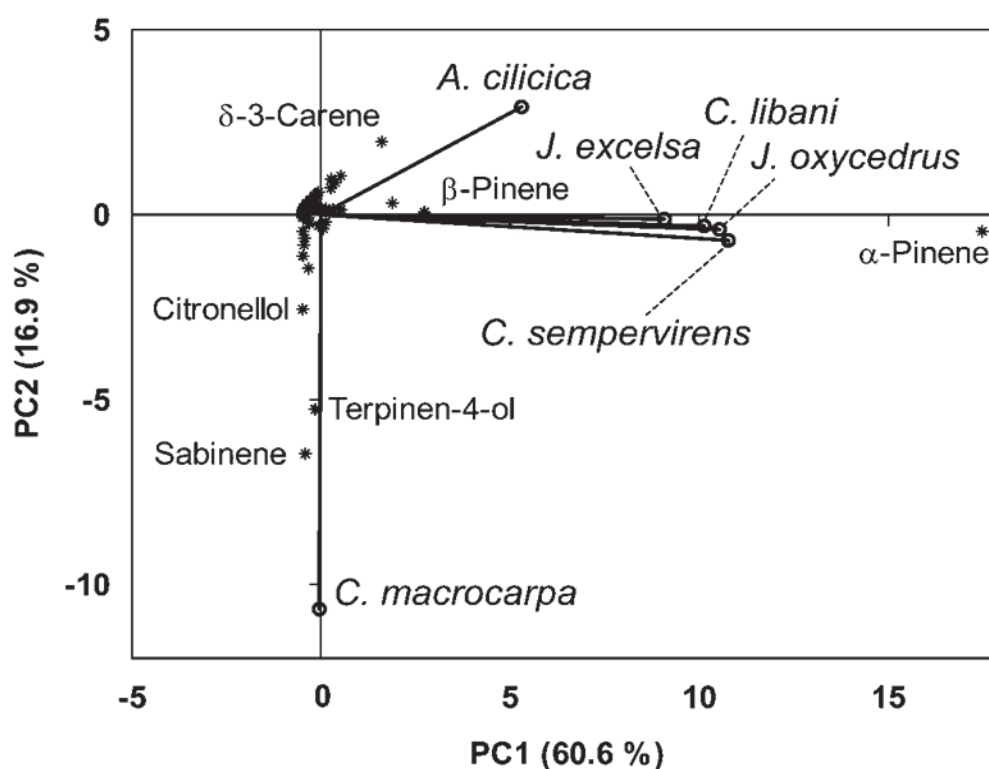


Figure 1: Biplot from the principal component analysis of the six conifers EOs

Antimicrobial activity. The results of the antimicrobial activity of the conifers EOs are reported in Table 2. EOs with minimal inhibitory concentrations (MICs) of 128 µg/ml and below are generally considered active [9] [10].

S. aureus was significantly sensitive to *J. excelsa*, *J. oxycedrus* and *C. libani* EOs (MIC of 64 µg/ml) and resistant to three others (MIC > 512 µg/ml). On the other hand, none of the EOs was active against *P. aeruginosa*, *E. coli* or *C. albicans* (MIC ≥ 512 µg/ml). Conversely, *Trichophyton* species were sensitive to most of the tested EOs (MICs from 32 to 512 µg/ml).

Table 2: Antimicrobial activity (MIC in µg/ml) of the six conifers essential oils

	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. soudanense</i>	<i>T. violaceum</i>	<i>T. tonsurans</i>
<i>A. cilicica</i>	> 512	> 512	> 512	64	64	32	32	64
<i>C. libani</i>	64		512	64				
<i>C. macrocarpa</i>	> 512	> 512	512	64	64	32	32	64
<i>C. sempervirens</i>	> 512	> 512	> 512	512				
<i>J. excelsa</i>	64		512	128				
<i>J. oxycedrus</i>	64		512	256				
Positive control	1 ^a	0.25 ^b	1 ^c	2 ^c	1 ^d	2 ^c	2 ^c	4 ^c

^a) Oxacillin; ^b) Gentamicin ^c) Fluconazole; ^d) Itraconazole

In order to elucidate the origin of the interesting activity of *C. macrocarpa* on the dermatophytes (MICs from 32 to 64 µg/ml), the activity of its major components were evaluated individually as well as a reconstructed EO against *Trichophyton rubrum* (Table 3). The artificial EO was prepared using pure terpenes of the major compounds in the same proportions, whereas the minor ones were replaced by DMSO (25.8%). Terpinene-4-ol was the most active compound (MIC of 64 µg/ml), suggesting a strong contribution to the antifungal activity of the oil. The other components showed less significant activities (MICs from 256 to 512 µg/ml).

The reconstructed EO was less active than the natural one (256 µg/ml vs 64 µg/ml), therefore the activity of *C. macrocarpa* EO couldn't be explained by a synergy between its major compounds. These results suggest that the minor constituents have played a significant role in the antimicrobial potential of the oil.

Table 3: Antimicrobial activity (MIC in µg/ml) of *C. macrocarpa* major compounds and a reconstructed essential oil prepared with the combination of these compounds.

	Sabinene	Terpinen-4-ol	Citronellol	γ -Terpinene	Citronellal	α -Terpinene	Camphor	<i>C. macrocarpa</i> reconstructed EO (74.2%)
<i>T. rubrum</i>	512	64	256	512	512	512	512	256

Conclusions

Lebanese conifers essential oils showed interesting antimicrobial activity particularly against *S. aureus* and *Trichophyton species*. These EOs should therefore be considered for a possible integration in antimicrobial preparations intended to be used in the treatment of superficial infections.

Acknowledgments

This work benefitted from an "Investissement d'Avenir" grant managed by the Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01) and from the support of CNRS Lebanon.

Experimental Part

Plant Material. Specimens of the six conifers were collected as follows:

- Leaves from *Abies cilicica* were collected from Fneidek, North Lebanon (34°27'54.48" N 36°13'10.74" E), at approximately 1560 m altitude, in January 2013.
- Cones from *Cedrus libani* were collected from Bcharre, North Lebanon (34°10'40.91" N 36°02'55.89" E), at approximately 1916 m altitude in September 2011.
- Leaves from *Cupressus macrocarpa* were collected from Achkout, Mount Lebanon (33°59'33.16" N 35°41'59.48" E), at approximately 1048 m altitude, in January 2013.
- Leaves from *Cupressus sempervirens* were collected from Kartaba, Mount Lebanon (34° 5'42.71" N 35°50'51.18" E), at approximately 1052 m altitude in December 2012.

- Twigs from *Juniperus excelsa* were collected from Kartaba, Mount Lebanon, (34°05'55.35" N 35°50'27.77" E), at approximately 1400 m altitude in October 2011.

- Twigs from *Juniperus oxycedrus* were collected from Kartaba, Mount Lebanon, (34°05'55.35" N 35°50'27.77" E), at approximately 1400 m altitude in September 2011.

The plants identification was based on 'Nouvelle flore du Liban et de la Syrie' by Paul Mouterde [11]. Air drying of the plant materiel was performed in a shady place for two weeks at room temperature.

Essential Oil Extraction. The extraction of the essential oils was carried out by hydrodistillation for three hours using a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia, 1997 [12].

GC Analyses. Analytical gas chromatography was performed on a Thermo Electron Corporation gas chromatograph fitted with a flame ionization detector (FID), a DB-5 MS capillary column (30 m × 0.25 mm) with 0.1 µm film thickness or a fused silica HP Innowax polyethylene glycol capillary column (50 m × 0.20 mm, film thickness 0.20 µm). Helium was the carrier gas (0.7 ml/min). The column temperature was initially set to 35 °C before being gradually increased to 85 °C at 5 °C/min, held for 20 min at 85 °C, raised to 300 °C at 10 °C/min and finally held for 5 min at 300 °C. Diluted 1 µl samples (1/100, v/v) were injected at 250 °C manually and in the splitless mode. Flame ionisation detection (FID) was performed at 310 °C.

GC-MS Analyses. The GC/MS analyses were performed using an Agilent 6890 gas chromatograph coupled with 5975 Mass Detector. The 7683 B auto sampler injected 1 µL of each diluted oil sample (1/100, v/v). A fused silica capillary column DB-5 MS (30 m × 0.25 mm internal diameter, film thickener 0.1 µm) or a fused silica HP Innowax polyethylene glycol capillary column (50 m × 0.20 mm, film thickness 0.20 µm) was used. Helium was the carrier gas (0.7 ml/min). The oven temperature program was identical to that described above (cf. GC Analysis). The mass spectra were recorded at 70 eV with an ion source temperature of 310 °C and a transfer line heated to 320 °C. The acquisition was recorded in full scan mode (50 – 400 amu).

Qualitative and Quantitative Analysis. Most constituents were identified by gas chromatography by comparing their retention indices (RI) with those from the literature [13] [14], or with those of authentic compounds obtained from Sigma-Aldrich (Lebanon and France). The retention indices were determined relatively to a homologous series of *n*-alkanes (C8 to C24) analysed under the same operating conditions. Concomitantly, their mass spectra on both columns were compared with those provided in the NIST and Wiley 275 libraries, our home-made library constructed with pure compounds and EOs of known composition or with mass spectra from the literature [13] [15]. The relative concentration of each compound was calculated based on the GC peak areas without using correction factors.

Statistical analysis. A principal components analysis based on Pearson correlation between essential oils chemical analyses was conducted with XLstat version 2014. In the biplot, samples (EOs) are displayed as vectors and EO components are displayed as points.

Antimicrobial activity. Gram (–) bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* CIP 82118, Gram (+) bacterial strain *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, yeast *Candida albicans* ATCC 10231 and the clinical isolates of dermatophyte *Trichophyton rubrum* SNB-TR1, *Trichophyton mentagrophytes* SNB-TM1, *Trichophyton soudanense* SNB-TS1, *Trichophyton violaceum* SNB-TV1 and *Trichophyton tonsurans* SNB-TT1 [16], were used in this study.

The antimicrobial activity of the EOs was measured using a broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [17 – 21]. The essential oils and its major components were diluted in DMSO and were tested at concentrations ranging from 512 to 16 µg/ml. The microplates were incubated at 37°C for 24 h for bacteria, 48 h for yeasts and 5 days for dermatophytes. The minimal inhibitory concentrations (MIC) refer to the lowest concentrations preventing visible microbial growth (Table 2, Table 3). Oxacillin and gentamicin (16 – 0.03 µg/ml) were used as reference antibiotics, while itraconazole (16 – 0.03 µg/ml) and fluconazole (64 – 0.125 µg/ml) were used as positive controls for the antifungal assays. The antimicrobial standards were purchased from Molekula – Dorset, UK and the pure terpenes from Sigma-Aldrich, France.

References

- [1] A. Farjon, C. N. Page (Eds), 'Conifers; Status Survey and Conservation Action Plan', IUCN/SSC Conifer Specialist Group, Cambridge, UK, 1999.
- [2] S. N. Talhouk, R. Zurayk, S. Khuri, *Oryx* **2001**, 35, 206.
- [3] W. R. Chaney, M. Basbous, *Econ. Bot.* **1978**, 32, 118.
- [4] J. A. Wilson, in 'Ancient Near Eastern Texts Relating to the Old Testament, 2nd ed.', Ed. J. B. Pritchard, Princeton Press, Princeton, 1995.
- [5] M. El Beyrouthy, Ph.D. Thesis, Université Droit et Santé – Lille 2, France, 2008.
- [6] S. Ahmet Sargin, *J. Ethnopharmacol.* **2015**, 173, 105.
- [7] M. El Beyrouthy, N. Arnold, A. Delelis-Dusollie, F. Dupont, *J. Ethnopharmacol.* **2008**, 120, 315.
- [8] World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
- [9] J. L. Rios, M. C. Recio, *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 100, 80.
- [10] L. Fahed, M. El Beyrouthy, N. Ouaini, V. Eparvier, D. Stien, *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 1892.
- [11] P. Mouterde, 'Nouvelle flore du Liban et de la Syrie', Tome III, Dar El Mashreq, Liban, 1970.
- [12] 'European Pharmacopoeia', 3rd edition, Council of Europe, Strasbourg, 1997.
- [13] W. Jennings, T. Shibamoto, 'Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography', Academic Press, New York, 1980.
- [14] N. W. Davies, *J. Chromatogr. A* **1990**, 503, 1.
- [15] R. P. Adams, 'Identification of essential oil components by gas chromatography/Mass spectroscopy' Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, 2007.
- [16] C. Nirma, V. Eparvier, D. Stien, *J. Nat. Prod.* **2015**, 78, 159.

- [17] Clinical and Laboratory Standards Institute. 'Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved standard', 8th Ed. Document M7-A8, CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute. 'Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard', 2nd Ed. Document M38-A2, CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- [19] Clinical and Laboratory Standards Institute. 'Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard', 3rd Ed. Document M27-A3, CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- [20] M. Khoury, M. El-Beyrouthy, N. Ouaini, M. Iriti, V. Eparvier, D. Stien, *Chem. Biodivers.* **2014**, *11*, 825.
- [21] A. M. S. Rodrigues, P. N. E. T. Theodoro, C. Basset, M. R. R. Silva, J. Beauchêne, L. S. Espindola, D. Stien, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1706.

Conclusion

Dans le cadre de la présente thèse des plantes aromatiques libanaises sélectionnées en se basant surtout sur des indications ethnopharmacologiques ont été récoltées de différentes régions libanaises. Elles ont été par la suite hydrodistillées pour produire une vingtaine d'huiles essentielles qui ont été analysées par GC/MS et éventuellement par RMN, et évaluées contre une gamme de pathogènes responsables d'infections cutanées chez l'homme.

Presque la moitié des HEs ont été actives sur au moins un des pathogènes. Les dermatophytes ont été les microorganismes les plus sensibles, un résultat qui s'explique par le rôle fonctionnel des COVs puisque la majorité des pathogènes infectant les plantes sont des champignons, la plupart filamenteux.^{189,190} Deux huiles, celles de *Salvia multicaulis* et *Achillea santolinoides* se sont distinguées par leurs activités sur *Staphylococcus aureus*.

L'analyse statistique menée sur la diversité chimique des HEs a montré leur appartenance à cinq groupes distincts. En liant compositions chimiques et activités biologiques on remarque que les huiles les plus actives se concentrent dans un des groupes et partagent alors des traits chimiques communs probablement responsables de leurs activités.

Il n'est pas rare, et cela a été constaté dans ce travail, de découvrir que ni les composés majoritaires identifiés ni les huiles synthétiques reconstruites à partir de ces composés ne puissent expliquer l'activité totale d'une huile naturelle correspondante. Cela met l'accent sur l'importance de la contribution des composés minoritaires au potentiel antimicrobien.

Un effet synergique entre une HE active et un antifongique commercial a également été mis en lumière. Ainsi, l'utilisation combinée d'huile essentielle d'*Hypericum scabrum* avec de l'amphotéricine B pourrait permettre de diviser par 32 la quantité d'amphotéricine B pour la même activité antifongique.

¹⁸⁹ Hawksworth, D.L., Allner, K., 1988. Administration and safety, in Hawksworth, D.L., Kirsop, B.E. (eds), Filamentous Fungi. Cambridge university press, Cambridge.

¹⁹⁰ González-Fernández, R., Prats, E., Jorrín-Novo, J.V., 2010. Proteomics of plant pathogenic fungi. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010, 1–36.

Il reste à noter que l'analyse de la composition chimique des huiles a été marquée par l'isolement et la caractérisation pour la première fois du santolinoïdol, un sesquiterpène du type bisabolène qui a été retrouvé dans l'huile essentielle d'*Achillea santolinoides* subsp. *wilhelmsii*.

Perspectives

La résistance aux antimicrobiens est un problème mondial majeur de plus en plus préoccupant. Le développement de nouveaux antimicrobiens classiques remplaçant les agents rendus inefficaces est certes l'une des stratégies les plus prometteuses visant à diminuer son ampleur. Mais cette solution demeure malheureusement momentanée. En fait tout agent antimicrobien sera tôt ou tard vaincu par la propagation des souches résistantes favorisée par le phénomène de pression de sélection exercée par l'agent lui-même. Il est donc nécessaire d'envisager toutes les alternatives possibles aux approches classiques, cela afin de diversifier l'arsenal thérapeutique antimicrobien.

Les huiles essentielles utilisées par les plantes dans leur défense contre les pathogènes sont naturellement composées d'un mélange de constituants les rendant capables d'agir sur plusieurs cibles de cet organisme. De ce fait, même les pathogènes les plus résistants ne vont pouvoir s'échapper à leurs actions et le développement des résistances sera par conséquent limité.

Les HEs ayant prouvé leur efficacité contre les bactéries et les champignons humains doivent être mis en profit par l'homme dans sa lutte contre la résistance antimicrobienne en remplaçant les antimicrobiens classiques dans le traitement des infections peu sévères. L'efficacité des antimicrobiens puissants sera ainsi conservée et ils pourront être utilisés en cas d'infections plus sévères.

D'un autre côté, les combinaisons entre HEs et antimicrobiens conventionnels qui ont présenté des effets synergétiques ou même additifs pourraient être exploitées d'une part pour surmonter le problème de résistance et d'autre part, en cas de synergie, pour préparer des actifs plus puissants.

Cependant, il faut toujours prendre en considération la faible sélectivité relative des HEs qui limite leurs applications aux infections topiques. Dans ce mode d'application (souvent utilisé traditionnellement), les huiles sont administrées en contact direct avec le pathogène et les effets indésirables qu'elles pourraient provoquer aux cellules saines en cas d'administration par voie générale en deviennent limités.

Enfin, il faut garder à l'esprit que l'usage d'huiles essentielles, souvent artisanal, est très répandu dans la médecine traditionnelle libanaise et que les travaux documentant composition, activité et toxicité des huiles sont utiles dans ce contexte.

Partie expérimentale

1. Récolte du matériel végétal et obtention des huiles essentielles

Le matériel végétal a été récolté de différentes régions du territoire libanais du nord au sud et de la côte aux montagnes. Les spécimens recueillis ont été identifiés selon les clés de la 'Nouvelle flore du Liban et de la Syrie' de Mouterde,⁵ par le botaniste Dr Marc El Beyrouthy (Faculté des Sciences Agronomiques, USEK – Liban) et des échantillons ont été déposés à l'herbier de botanique de l'USEK.

Suivant l'espèce étudiée, différentes parties du matériel végétal frais ont été lavées, coupées, séchées à l'ombre et à température ambiante pendant deux semaines puis soumises à la distillation. Les huiles essentielles (HEs) ont été obtenues par hydrodistillation pendant une durée de 3 h (selon le procédé décrit dans la Pharmacopée européenne)¹⁹¹ dans un hydrodistillateur de type Clevenger et les rendements (v/m, relatif à la masse de plantes sèches) ont été calculés.

Le nom scientifique, le numéro d'herbier, le lieu et la date de récolte, la partie récoltée ainsi que les rendements en HEs obtenus de chaque spécimen sont décrits dans le Tableau 1.

2. Analyses chimiques des huiles essentielles

2.1. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (GC) et couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (GC/MS)

2.1.1. Analyses GC

La chromatographie analytique en phase gazeuse a été effectuée sur un chromatographe Thermo Electron Corporation équipé d'une colonne DB-5 MS capillaire (30 m x 0,25 mm de diamètre interne, épaisseur du film : 0,1 µm) et d'une colonne HP Innowax polyéthylène glycol (50 m x 0,20 mm de diamètre interne, épaisseur du film : 0,20 µm). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un flux constant de 0,7 ml/min. Le programme débute à une température de 35 °C et augmente progressivement de 5 °C/min pour atteindre 85 °C. Cette

¹⁹¹ Pharmacopée Européenne, 1997. Conseil de l'Europe, Strasbourg. 3^{ème} Ed., 1–1799.

température est maintenue pendant 20 min, puis le gradient de température se poursuit avec une montée de 10 °C / min jusqu'à un palier de 300 °C pendant 5 min. Les huiles essentielles ont été diluées dans du pentane (1/100, v/v) et 1 µL de chaque solution a été injecté en mode splitless à 250 °C. La détection à ionisation de flamme (FID) a été réalisée à 310 °C.

2.1.2. Analyses GC/MS

Les analyses chromatographiques en phase gazeuse, couplées à la spectrométrie de masse ont été effectuées grâce à un chromatographe Agilent 6890 couplé à un détecteur de masse 5975. Les colonnes et le programme de température du four choisis pour les analyses GC/MS sont identiques à ceux utilisés pour les analyses GC, décrits dans la section précédente. L'hélium a été également utilisé comme gaz vecteur à un flux constant de 0,7 ml/min. Les spectres de masse ont été enregistrés à 70 eV et les températures des différentes parties du spectromètre ont été fixées à 310 °C pour la source d'ions et 320 °C pour la ligne de transfert. Les huiles essentielles ont été diluées dans du pentane de qualité CLHP (5 mg/ml) et 1 µL de chaque solution a été injecté en mode splitless grâce à échantillonneur automatique 7683 B. Les spectres de masse ont été enregistrés entre 50 et 550 uma à raison de 0,978 scans/seconde.

2.1.3. Identification et quantification

La plupart des constituants ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse, par comparaison de leurs indices de rétention (IR) avec ceux de la littérature,^{192,193} ou avec ceux de standards commerciaux obtenus de Sigma-Aldrich (Liban et France). Les indices de rétention de Kovats (IK) de chacune des molécules ont été déterminés par rapport aux temps de rétention d'une série d'alcane linéaires (allant de C8 à C24) analysés dans les mêmes conditions, selon la formule suivante :

$$IK_x = 100 \left[n + (N - n) \frac{\log(t(x)) - \log(t(n))}{\log(t(N)) - \log(t(n))} \right]$$

¹⁹² Davies, N.W., 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A* 503, 1–24.

¹⁹³ Jennings, W., Shibamoto, T., 1980. Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. Academic Press, New York.

Avec :

x : composé à identifier

n : nombre d'atomes de carbone de l'alcane ayant élué juste avant le composé à identifier

N : nombre d'atomes de carbone de l'alcane ayant élué juste après le composé à identifier

t : temps de rétention

De plus, l'identification a été faite par comparaison des spectres de masse avec ceux stockés dans les bibliothèques NIST et Wiley 275 et notre propre bibliothèque, ou avec des spectres de masse de littérature^{193,194}. Des huiles essentielles standard de composition certifiée (comme l'HE de *Rosmarinus officinalis* L. - Phytosun'Aroms, Plélo, France) ont été analysées dans des conditions similaires pour la comparaison des temps de rétention et des spectres de masse.

2.2. Fractionnement et extraction

2.2.1. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Les analyses et fractionnement de l'huile essentielle d'*Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* sur CLHP ont été effectuées sur un système Gilson équipé d'un dispositif de pompage 322, d'un collecteur de fractions GX-271, d'un détecteur UV à barrettes de diodes Gilson 171, et d'un détecteur DEDL prepELSII. La colonne analytique utilisée est une colonne Phenomenex Luna de type C18 (5 µm, 4,6 × 250 mm) et la colonne utilisée pour le fractionnement est une colonne Phenomenex Luna de type C18 (5 µm, 21,2 × 250 mm). Le débit a été fixé à 1 ml/min pour les expériences en mode analytique et à 21 ml/min pour les expériences en mode préparatif, en utilisant un gradient linéaire d'eau mélangé avec une proportion croissante d'acétonitrile (H₂O/CH₃CN : 70/30 à 0/100), suivi d'un palier d'acétonitrile pur pendant 25 min. En mode préparatif, des fractions continues de 25 ml ont été collectées et analysées par GC/MS pour identifier celle qui contient la plus forte proportion relative du produit devant être identifié (fraction 20).

L'acétonitrile utilisé est de qualité CLHP et l'eau utilisée est de l'eau milliQ filtrée sur un appareil Millipore® Synergy.

¹⁹⁴ Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.

2.2.2. Extraction

L'extraction des composés organiques volatiles contenus dans les fractions obtenues par CLHP a été réalisée avec de l'éther diéthylique dans une ampoule à décanter. Pour ce faire, la fraction choisie a été diluée dans de l'eau (250 ml) et dans de l'éther (250 ml). La phase organique a été récupérée et lavée avec 3 x 50 ml d'eau, séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée avec précaution et sans chauffer.

2.3. Analyses RMN

Les expériences de résonance magnétique nucléaire ont été effectuées sur un appareil Bruker Avance® 600 MHz équipé d'une sonde de détection inverse de 1 mm. La fraction 20 a été dissoute dans du chloroforme-d (CDCl₃). L'attribution des différents signaux a été effectuée à l'aide des techniques de RMN à une dimension ¹H et ¹³C associées à des expériences à deux dimensions de corrélation homonucléaire (¹H-¹H) COSY (COrrelation SpectroscopY) et NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) et hétéronucléaire (¹H-¹³C) HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Les spectres ont été traités avec le logiciel ACD-NMR version 12.01. Les constantes de couplage (*J*) sont mesurées en Hertz (Hz), et les déplacements chimiques (δ) sont mesurés en ppm (parties par millions) en prenant comme référence le déplacement chimique du tétraméthylsilane (TMS). Les abréviations suivantes sont utilisées dans les descriptions des spectres : *s* (singulet), *d* (doublet), *t* (triplet), *m* (multiplet), *br* (broad : signal large).

2.4. Analyses UPLC-ESI-TOFMS

Les mesures à haute résolution ESI-TOFMS ont été effectuées en utilisant un système Waters Acquity UPLC muni d'une colonne de dérivation et couplé à un spectromètre de masse Waters Micromass LCT Premier temps de vol équipé d'une interface électrospray (ESI)

2.5. Mesure du pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire a été mesuré sur un polarimètre Anton Paar MCP 300 dans une cellule de 350 μ L de 100 mm de long.

2.6. Analyse comparative des profils des huiles essentielles obtenus par GC/MS

2.6.1. Conversion des données

L'ensemble des données obtenues des analyses de GC/MS ont été regroupées dans un fichier Excel avant de procéder à l'analyse statistique. Ce fichier regroupe le nom des huiles essentielles correspondant à l'espèce de plante étudiée, les molécules identifiées, leurs temps de retentions et leurs proportions relatives. A partir de ces données brutes un tableau croisé dynamique est obtenu.

2.6.2. Traitement des données sous XLstat

Le traitement a été réalisé sur la base de statistiques multivariées, en utilisant le logiciel XLSTAT version 2013.4.08 suivant la classification ascendante hiérarchique (CAH) basée sur les distances euclidiennes selon la méthode d'agrégation de Ward permettant l'observation des degrés de dissimilarité entre les variables (huiles essentielles) du jeu de données.

3. Analyses biologiques des huiles essentielles

3.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne

3.1.1. Pathogènes

L'activité antibactérienne et antifongique de la totalité des huiles essentielles obtenues a été évaluée sur quatre pathogènes humains de référence. Nous avons choisi de tester nos huiles sur une bactérie à Gram positif (*Staphylococcus aureus*), une bactérie à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*), une levure (*Candida albicans*) et un champignon dermatophyte (*Trichophyton rubrum*) (Tableau 3).

Certaines huiles essentielles actives ont été testées également sur une gamme plus large de pathogènes humains, notamment sur la souche *S. aureus* résistante à la méthicilline et sur plusieurs champignons dermatophytes du genre *Trichophyton* (*T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *T. soudanense*, *T. tonsurans*) (Tableau 3).

Les pathogènes sont conservés sur milieu incliné (Müller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons et la levure). Les souches sont repiquées toutes les deux semaines, puis incubées et conservées à 37 °C.

Tableau 3 : Identification des souches pathogènes utilisées

		Provenance	Code	Référence GenBank
Bactéries	<i>S. aureus</i>	ATCC	29213	-
	<i>S. aureus</i> (MRSA)	ATCC	33591	-
	<i>P. aeruginosa</i>	CIP	82118	-
Levure	<i>C. albicans</i>	ATCC	10231	-
Champignons filamenteux	<i>T. rubrum</i>	Isolat clinique*	SNB-TR1	KC692746
	<i>T. mentagrophytes</i>	Isolat clinique*	SNB-TM1	KF360239
	<i>T. violaceum</i>	Isolat clinique*	SNB-TV1	KF360236
	<i>T. soudanense</i>	Isolat clinique*	SNB-TS1	KF360237
	<i>T. tonsurans</i>	Isolat clinique*	SNB-TT1	KF360238

*Les souches provenant d'isolats cliniques ont été identifiées et fournies par Philippe Loiseau de l'Université Paris-Sud. Leur espèce a été confirmée par séquençage. Les séquences ITS ont été déposées dans la base de données GenBank (NCBI).

3.1.2. Préparation des inocula de pathogènes

Les solutions mères de pathogènes sont préparées par mise en suspension d'une colonie (pour les bactéries ou les levures) ou des parties visibles des mycéliums (pour les champignons filamenteux) dans de l'eau distillée stérile. La suspension est ajustée pour atteindre une densité optique de 0,5 Mc Farland (correspondant à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml) et ensuite diluée dans le milieu de culture (M-H ou RPMI) dans une proportion de 1:100 (v/v, bactéries), 1:1000 (v/v, levures) et 1:10 (v/v, dermatophytes).

3.1.3. Test de Microdilution

L'évaluation de l'activité antimicrobienne est réalisée par la méthode de microdilution qui permet de déterminer la sensibilité d'un micro-organisme à un agent antimicrobien. Ce test mesure la concentration minimale inhibitrice (CMI, en µg/ml) définie comme la plus faible concentration d'antimicrobien permettant d'inhiber toute croissance microbienne visible.

Ces essais sont réalisés selon les protocoles de référence établis par le CLSI pour les tests de susceptibilité pour bactéries, levures et champignons filamenteux^{195,196,197}.

Le test consiste à mettre en contact les huiles essentielles et molécules testées avec une solution de pathogènes en milieu de culture liquide ; le milieu Müller-Hinton (M-H) est utilisé pour les bactéries et le milieu RPMI pour les champignons. Le milieu RPMI est préalablement tamponné par une solution de MOPS (acide 3-(*N*-morpholino)-propane sulfonique à une concentration de 0,165 mol/L) pour atteindre un pH neutre et est ensuite filtré sur une membrane polyéthersulfone (0,22 µm).

Les huiles essentielles ainsi que leurs composants majoritaires, dilués dans du DMSO, ont été testés à des concentrations allant de 512 à 1 µg/ml.

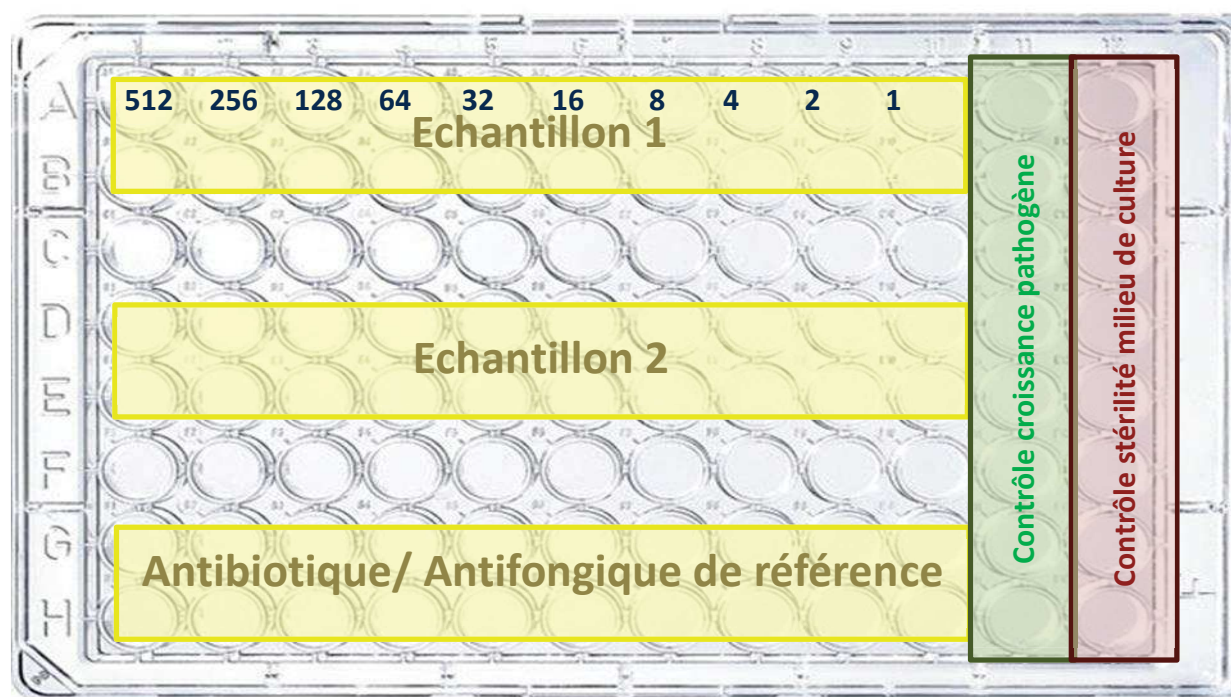


Figure 21 : Plan de plaque 96 puits utilisé pour le test de microdilution des huiles essentielles

¹⁹⁵ Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 7th edition. Approved Standard, 8th ed. Document M7-A8, CLSI, Wayne, PA, USA.

¹⁹⁶ Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard, 2nd ed. Document M38-A2, CLSI, Wayne, PA, USA.

¹⁹⁷ Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard, 3rd ed. Document M27-A3, CLSI, Wayne, PA, USA.

Sur une plaque de 96 puits, 100 μ L de milieu sont déposés dans chacun des puits. 20 μ L d'échantillon dilué dans du DMSO (à partir d'une solution stock à 10,24 mg/ml) sont ajoutés dans la première colonne et où les puits sont complétés par 80 μ L de milieu, pour un volume total de 200 μ L. Des dilutions en série au demi sont alors effectuées de la première colonne, jusqu'à la dixième. Ensuite, 100 μ L de suspension de pathogène est ajoutée dans tous les puits sauf ceux de la douzième colonne. Les dix premières colonnes de la plaque servent donc à mesurer la CMI, la onzième colonne est un témoin de la croissance du pathogène, et la douzième, un témoin négatif pour vérifier la stérilité du milieu de culture (Figure 21).

Chaque échantillon est testé en duplicata et compte-tenu du caractère volatile des huiles essentielles, les différents échantillons ont été espacés par des lignes de puits vides.

Les composés antimicrobiens, utilisés comme contrôles positifs sont également déposés dans les premiers puits (20 μ L). L'oxacilline est utilisé comme antibiotique de référence pour *S. aureus*, la vancomycine pour SARM, la gentamycine pour *P. aeruginosa*, l'itraconazole et le fluconazole sont utilisés comme antifongiques de référence pour la levure et les champignons dermatophytes. Des solutions mères d'oxacilline, de vancomycine, de gentamicine et d'itraconazole sont préparées dans le DMSO à 0,32 mg/ml afin d'obtenir une gamme de concentration de 16 à 0,03 μ g/ml. La solution mère de fluconazole est préparée à la concentration de 1,28 mg/ml pour obtenir une gamme de concentration de 64 à 0,125 μ g/ml.

Les plaques sont incubées à 37 °C et la lecture du résultat du test se fait au bout de 24 heures pour les bactéries, 2 jours pour la levure et 5 jours pour les champignons dermatophytes. La CMI est déterminée comme la plus faible concentration correspondant au puits où la croissance du pathogène est totalement absente.

3.1.4. Test de synergie entre une huile essentielle et un antimicrobien commercial

Ce test consiste à mettre en combinaison deux produits afin d'évaluer de potentielles synergies dans l'activité biologique. L'huile essentielle et l'antibiotique ou l'antifongique sont déposés en dilutions en séries croisées sur une plaque de 96 puits selon le schéma de plaque présenté ci-dessous (Figure 22) :

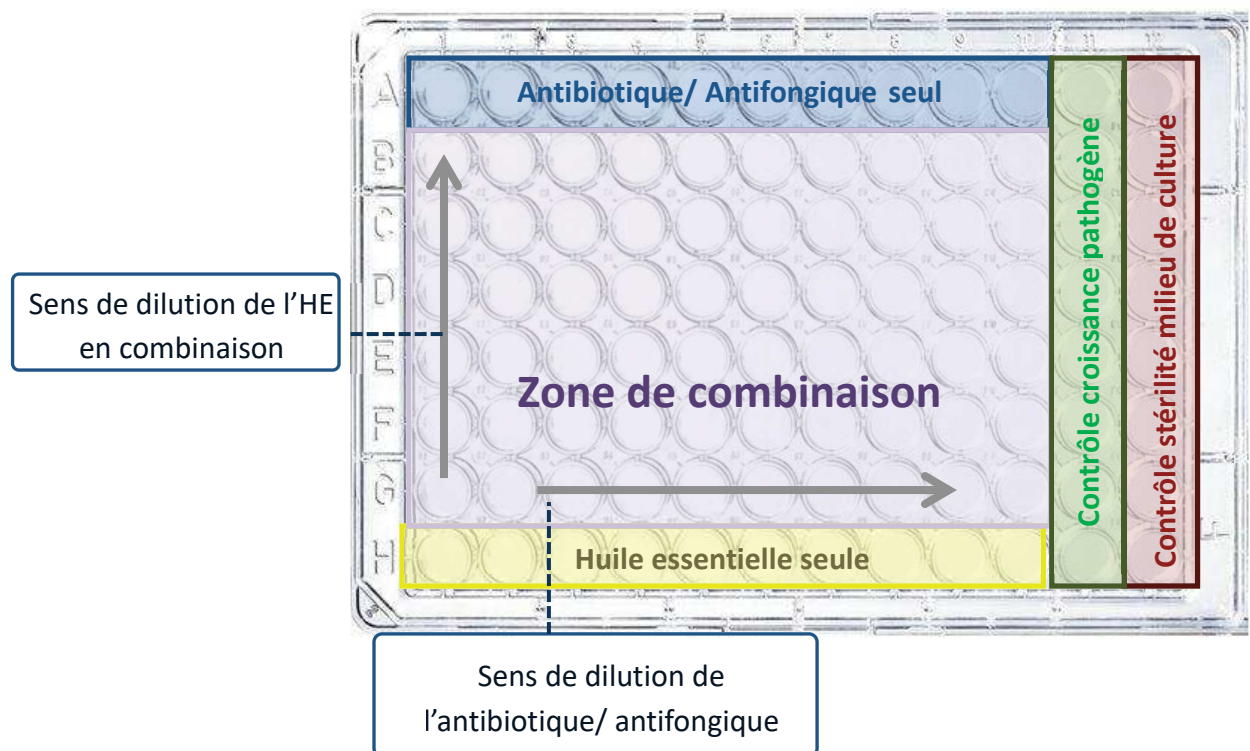


Figure 22 : Schéma de plaque d'interaction entre huile essentielle et antibiotique / antifongique

Il est basé sur la méthode de microdilution décrite dans la section précédente et le protocole a été déjà décrit par Shin et Lim, et Houël et al. ^{198,199}

Comme pour le test de microdilution, 100 μL de milieu stérile sont d'abord déposés dans chacun des puits de la plaque.

20 μL d'une solution d'HE est déposée dans le premier puits de la ligne H (H1) avec une concentration $20 \times C$ (où C est la concentration finale souhaitée dans le puits H1) et complété avec 80 μL de milieu.

40 μL d'une solution antibiotique ou antifongique est déposée dans le puits G1 avec une concentration $20 \times C$ (où C est la concentration finale souhaitée dans le puits G1) et complété avec 60 μL de milieu.

¹⁹⁸ Shin, S., Lim, S., 2004. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1289–1296.

¹⁹⁹ Houël, E., Rodrigues, A.M.S., Jahn-Oyac, A., Bessière, J.-M., Eparvier, V., Deharo, E., Stien, D., 2013. *In vitro* antidermatophytic activity of *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse essential oil alone and in combination with azoles. *Journal of Applied Microbiology* 116, 288–294.

20 μ L d'une solution antibiotique ou antifongique est déposée dans les puits F1 à A1 avec une concentration $20 \times C$ (où C est la concentration finale souhaitée dans ces puits) et complété avec 80 μ L de milieu.

Les dilutions en série au demi sont ensuite effectuées dans le sens horizontal sur les lignes A-H des colonnes 1 à 10.

20 μ L d'une solution d'HE est déposée dans les puits G1 à G10 avec une concentration de $20 \times C$ (où C est la concentration finale souhaitée dans ces puits). La gamme de concentration choisie des HEs en combinaison dépend de la sensibilité de chaque micro-organisme à l'HE testée, préalablement définie dans le test de microdilution par détermination de la CMI. Les puits de la ligne G sont ensuite complétés par 80 μ L du milieu de culture.

Les dilutions en série au demi sont ensuite effectuées dans le sens vertical sur les colonnes 1-10 des lignes G à B.

Les plaques sont ensuite inoculées avec les solutions de pathogènes (100 μ L d'inoculum par puits) selon le même protocole que pour le test de microdilution. Après le temps d'incubation nécessaire pour chaque pathogène, les CMI des produits purs et des mélanges sont déterminées.

Les résultats sont analysés graphiquement par la méthode des isobogrammes (Figure 23). Les CMIs enregistrées pour chaque proportion des 2 produits testés en combinaison sont tracées sous forme de coordonnées sur le graphique et l'allure de la courbe obtenue permet de déterminer l'effet de l'association :

- Courbe concave : Effet synergique
- Droite diagonale : Effet additif (pas d'interaction)
- Courbe convexe : Effet antagoniste

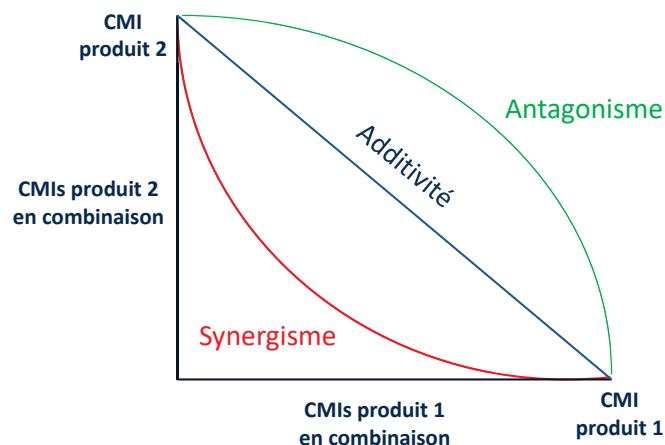


Figure 23 : Représentation graphique et interprétation d'un isobologramme

La quantification des effets a été réalisée par le calcul des concentrations inhibitrices fractionnaires (CIF) et des indices de CIF (ICIF). Les CIFs sont calculées en divisant la CMI de la combinaison des deux produits par la CMI des produits testés individuellement, suivant ces formules :

$$\text{CIF de l'HE} = \left(\frac{\text{CMI de l'HE en combinaison}}{\text{CMI de l'huile seule}} \right)$$

CIF de l'antimicrobien (antibiotique ou antifongique commercial)

$$= \left(\frac{\text{CMI de l'antimicrobien en combinaison}}{\text{CMI de l'antimicrobien seul}} \right)$$

où la CMI de l'HE ou de l'antimicrobien en combinaison est celle de la combinaison la plus efficace en cas de synergie et celle de la combinaison la moins efficace en cas d'antagonisme.

L'ICIF obtenu par addition des deux valeurs de CIF, est interprété comme suit^{198,200} :

- ICIF ≤ 0,5 : association synergique
- 0,5 < ICIF ≤ 2 : association additive ou indifférente (pas d'interaction)

²⁰⁰ Pyun, M.-S., Shin, S., 2006. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine* 13, 394–400.

- ICIF > 2 : association antagoniste

3.2. Evaluation de la cytotoxicité

L'activité cytotoxique des huiles essentielles a été testée sur les lignées cellulaires MRC5 (cellules saines fibroblastiques de poumon fœtal humain) par la ciblothèque cellulaire de l'ICSN selon le protocole décrit par Tempête et al. .²⁰¹

La concentration inhibant 50 % de la croissance cellulaire (CI_{50}) a été déterminée et les indices de sélectivité (IS) ont été calculés selon l'équation suivante : $IS = CI_{50}/CMI$.

²⁰¹ Tempête, C.; Werner, G.; Favre, F., 1995. *In vitro* cytostatic activity of 9- demethoxyprothramycin B. European Journal of Medicinal Chemistry 30, 647–650.

Annexes

1. Annexe 1 : Composition chimique des huiles essentielles qui n’ont pas fait l’objet d’une publication ou d’un projet de publication

Tableau 1 : Composition chimique des 13 huiles essentielles qui n’ont pas fait l’objet d’une publication ou d’un projet de publication

		<i>Achillea falcata</i>	<i>Calamintha origanifolia</i>	<i>Cupressus sempervirens</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Laurus nobilis</i>			<i>Lavandula vera</i>	<i>Micromeria mirtifolia</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Origanum majorana</i>	<i>Salvia tomentosa</i>	<i>Achillea argentea</i>
		Fleurs	Partie aérienne	Fleurs	Partie aérienne	Feuilles	Fruits	Tiges	Partie aérienne	Partie aérienne	Partie aérienne	Partie aérienne	Partie aérienne	Fleurs
R _i ^a	R _i ^b	Composés												
908	1044	Santolina triène												1,53
925	1030	Tricyclène		0,46										
929	1035	α -Thujène										0,68		
938	1076	α -Pinène	2,50	0,23	70,32	1,96	2,12	4,49	1,28	0,76	1,05	0,28	0,74	1,71
953	1076	Camphène				0,25	0,24	2,12	0,3	0,46			1,73	1,19
973	1132	Sabinène	3,16		0,65		1,55	1,44	0,28			3,00		0,20
975	1312	1-Octèn-3-ol								1,03				
980	1118	β -Pinène		1,82	3,00	0,22	3,57	3,64	1,44	0,20	0,57		4,78	1,12
993	1174	Myrcène			2,50	0,51		0,41		0,57	1,01		0,73	7,09
1005	1188	α -Phellandrène	1,30			0,93		0,51					0,86	1,79
1013	1159	δ -3-Carène						0,44						
1013	1188	α -Terpinène	1,06		0,25		0,26				1,05		6,19	1,16
1025	1280	p -Cymène	0,58			6,80	0,77		0,64		2,5		4,08	1,66
1030	1203	D-Limonène		2,44	3,00					0,64				
1033	1218	β -Phellandrène				3,31						4,18	3,26	
1034	1213	Eucalyptol	5,13				32,35	12,88	20,24	4,19		8,25		15,97
1038	1222	Santolina alcool												24,66
1045	1269	<i>cis</i> - β -Ocimène			0,29			1,47		0,84				
1050	1253	<i>trans</i> - β -Ocimène					17,26	0,21	0,26					
1057	1255	γ -Terpinène	1,03		0,31		0,57		0,27		1,84		10,14	1,1
1058	1556	<i>cis</i> -Hydrate de sabinène	1,27						0,25				2,15	1,08
1079	1401	α -Fenchone			4,76							0,32		
1082	1510	Artémisia alcool												0,21
1086	1265	α -Terpinolène	0,32		1,77		0,3		0,19	0,49		2,50		
1094	1392	2-Nonanone						0,45						
1096	1474	<i>trans</i> -Hydrate de sabinène	0,55									4,64		0,47
1098	1553	Linalool				6,96	0,25	4,96	37,64	3,46	17,63	3,83	2,04	
1105	1430	α -Thujone	26,85											
1115	1449	β -Thujone	10,90											
1117	-	<i>cis</i> - p -Menth-2-èn-1-ol	1,73									1,67	6,21	
1128	1487	Campholénal												0,25

			<i>Achillea falcata</i>	<i>Calamintha origanifolia</i>	<i>Cupressus sempervirens</i>	<i>Foeniculum vulgare</i> 0,20	<i>Laurus nobilis</i> 1,63	<i>Lavandula vera</i> 1,09	<i>Micromeria mirtifolia</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Origanum majorana</i>	<i>Salvia tomentosa</i>	<i>Achillea argentea</i>
1134	1493	<i>allo</i> -Ocimène											
1138	1654	<i>trans</i> -Pinocarvéol											0,50
1139	-	<i>trans-p</i> -Menth-2-èn-1-ol	1,74	0,2							1,20	4,11	
1145	1532	Camphor						7,98	1,33	0,52		4,96	3,25
1152	1683	<i>trans</i> -Verbénol										2,5	
1157	1475	Menthone		2									
1163	1587	Pinocarvone	0,35										0,51
1165	1502	Isomenthone		42,64									
1167	1719	Bornéol	0,75				0,2	5,58	1,26	0,15		5,4	5,32
1170	-	Lavandulol						1,46	1,27				
1173	1604	Isopinocamphone		7,05									
1176	1611	Terpinèn-4-ol	3,00		1,05	5,31	4,47	10,48	1,55	0,44	29,11	1,99	1,86
1187	1605	Néoisomenthol		4,27									
1189	1706	α -Terpinéole	1,08		0,64	2,5	2,13	1,93	1,36	0,98	5,03	2,5	0,77
1191	1509	Butyrate d'héxyle						1,20					
1192	1674	<i>cis</i> -Pipéritol	0,49										
1193	1648	Myrténal									0,38	2,35	
1196	1804	Myrténol		0,2									0,17
1197	1670	Estragole				18,85			1,39	30,54			0,17
1217	1741	<i>trans</i> -Pipéritol	1,53								0,61	3	
1219	1847	α -Acétate de fenchyle				0,89							
1228	1812	<i>cis</i> -Nérol					0,33	0,18					
1229	1775	β -Acétate de fenchyle				16,03							
1233	1662	Pulégone		22,67									
1239	1831	Aldéhyde cuminique								0,24			
1241	1752	Carvone							1,93	0,20	0,26		
1243	-	Isovalérate d'héxyle						0,22					
1249	1739	Pipéritone	10,60	6,34									
1253	1486	Aldéhyde anisique				0,39							
1259	1665	Acétate de linalyle						3,00			1,53		
1262	1781	<i>cis</i> -Anéthole				0,18							
1283	1847	<i>trans</i> -Anéthole				22,23			17,42				
1285	1597	Acétate de bornyle			0,94		0,19	1,84	0,69			1,7	4,18
1288	1598	Acétate de lavandulyle							0,89	0,37			0,72
1293	2198	Thymol							8,03		0,45		
1298	1585	2-Undécanone					0,37	0,72	0,62				
1298	1549	Acétate de menthyle		1,35									
1299	2239	Carvacrol				0,80			6,79	0,35	0,86		
1311	1667	Acétate de pinocarvyle		1,14									
1333	1709	α -Acétate de terpinyle		0,76	1,62	12,81	1,51	11,23	1,03				
1343	1948	Piperiténone		2,36									
1352	1466	α -Cubébène			0,62		0,52						
1356	2186	Eugénol				1,85	0,39	1,17	1	3,00			
1359	1735	<i>cis</i> -Acétate de néryle									0,22		
1377	1497	α -Copaène					0,57		2,06				

			<i>Achillea falcata</i>	<i>Calamintha origanifolia</i>	<i>Cupressus sempervirens</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>		<i>Laurus nobilis</i>		<i>Lavandula vera</i>	<i>Micromeria mirtifolia</i>	<i>Ocimum basilicum</i> 6,13	<i>Origanum majorana</i>	<i>Salvia tomentosa</i>	<i>Achillea argentea</i>
1378	2050	<i>trans</i> -Cinnamate de méthyle													
1379	1760	<i>trans</i> -Acétate de néryle											0,39		
1387	1600	β -Elémène					0,23	10,36	0,28		1,39				
1402	1588	Méthyleugénol					11,56	1,02	13,67			9,08			
1407	1574	Longifolène			0,47										
1411	1568	Cédrène			0,47										
1415	1612	β -Caryophyllène	0,37		0,74			1,83		0,49	6,8	1,53	2,50	2,1	
1436	1573	<i>trans</i> - α -Bergamotène									1,07	3,11			
1437	1628	Aromadendrène											0,25		
1439	1650	α -Guaiène						0,99							
1452	1668	α -Humulène			0,30			0,68			1,5	0,80			
1455	1689	β -Farnésène								2,49	1,07	0,28			
1477	1726	Germacrène D			0,34			0,72			1,58	0,48		1,42	0,39
1478	1704	γ -Muuroolène									1,49			1,5	
1483	1784	α -Curcumène	0,23								2,5				
1485	1711	β -Sélinène						0,39						1,3	
1495	1740	Valencène												1,63	
1505	1728	α -Bulnésène										0,36			
1508	1741	β -Bisabolène										0,16			
1515	1776	γ -Cadinène										1,63		1,14	
1524	1780	β -Sesquiphellandrène	0,25												
1525	1772	δ -Cadinène						0,35			2	0,47		2,03	
1541	1918	α -Calacorène									1,48				
1555	1948	Elémicine					0,56		1,16						
1566	2050	<i>trans</i> -Nérolidol									1,23				
1573	-	Palustrol												2,5	
1574	2069	Germacrène D-4-ol												1,22	
1577	2008	Spathulénol					1,39		4,1			0,62	1,62	1,64	0,26
1580	2152	Oxyde de caryophyllène	0,28				0,29		1,21		7,6	0,50	0,68	1,8	
1591	2104	Viridiflorol							0,6					5	
1599	2120	Cédrol			2,50										
1629	2025	<i>epi</i> -Globulol								0,44		0,74		2,41	
1640	2188	<i>T</i> -Cadinol							0,65			4,36		2,09	
1645	2145	Torréyol							0,32					1,16	
1649	2188	α -Eudesmol	0,75				0,58	0,42	1,36						
1650	2256	α -Cadinol										0,33		1,81	
Total identifié			77,78	95,47	92,23	78,33	86,66	71,08	74	82,36	89,07	94,42	90,47	95,07	68,24

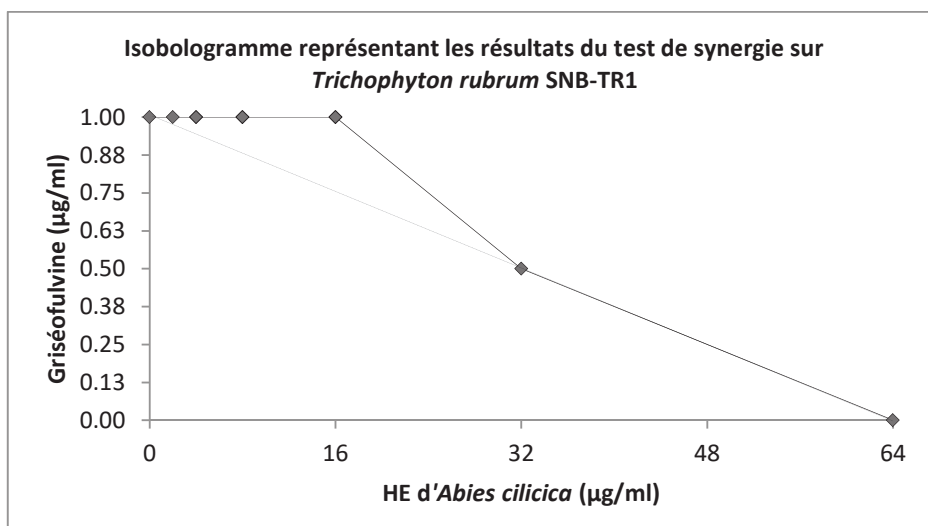
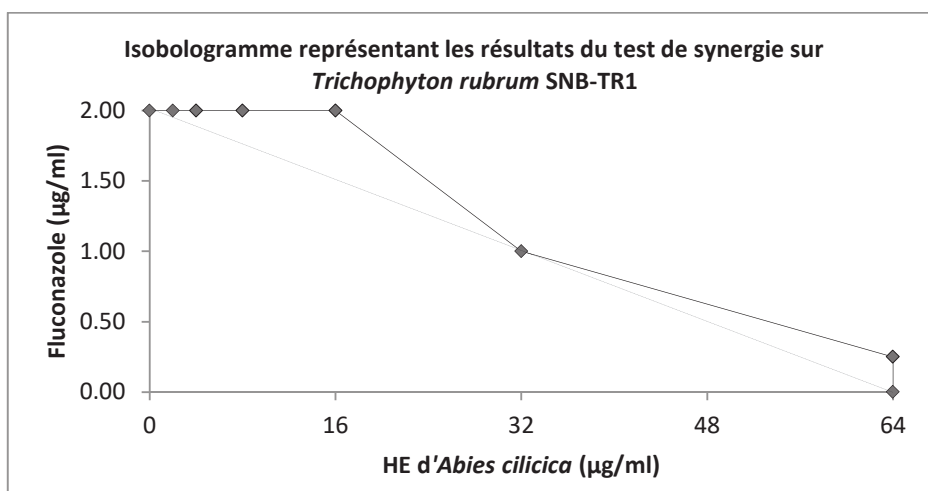
2. Annexe 2 : Résultats de l'activité antimicrobienne des HEs lors du second criblage

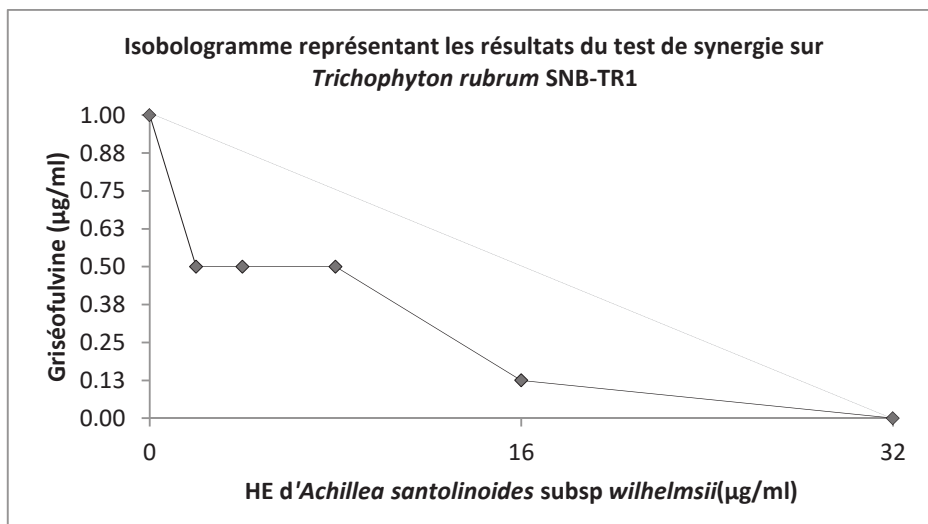
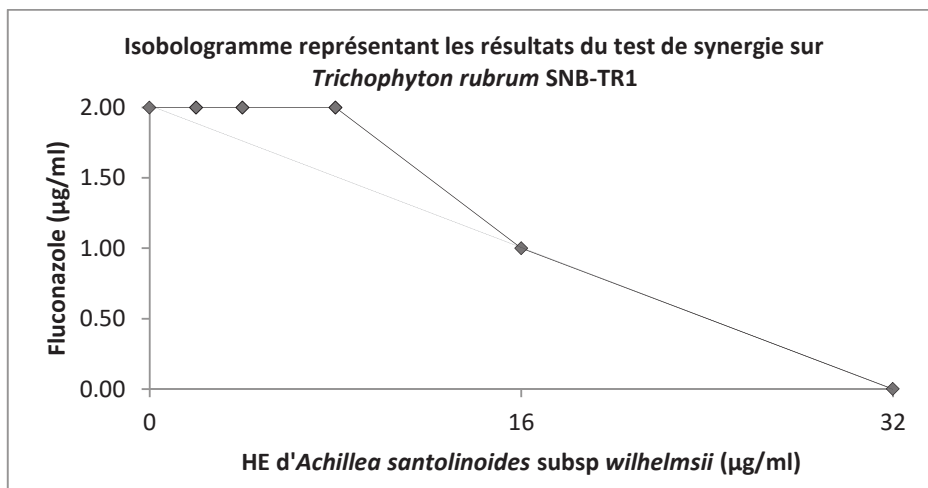
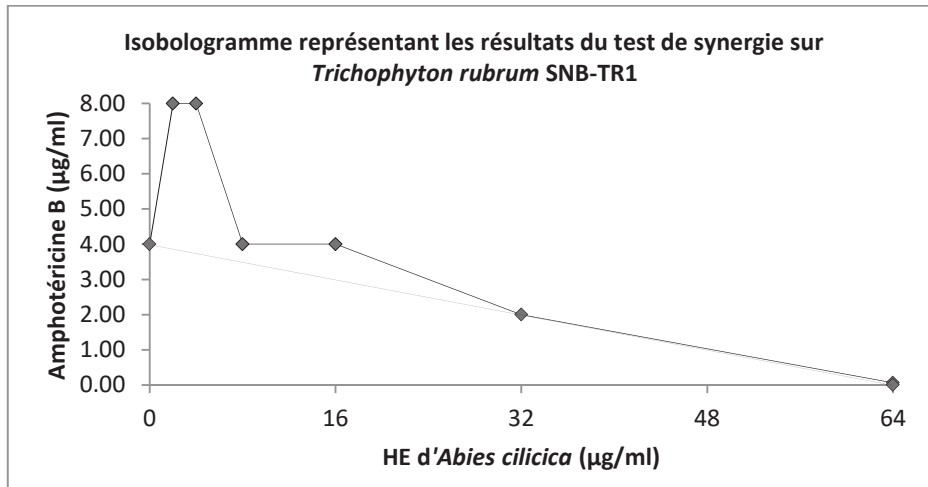
Tableau 2 : Activités antimicrobiennes (CMI en µg/ml)

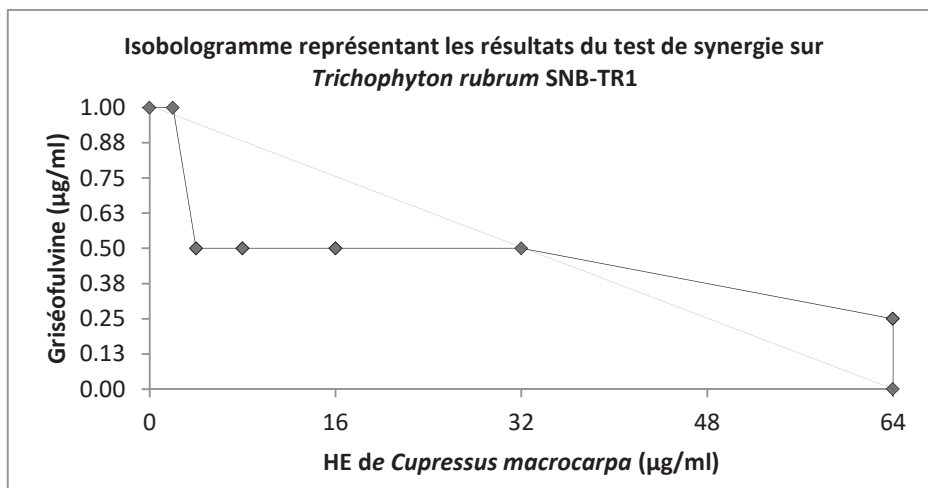
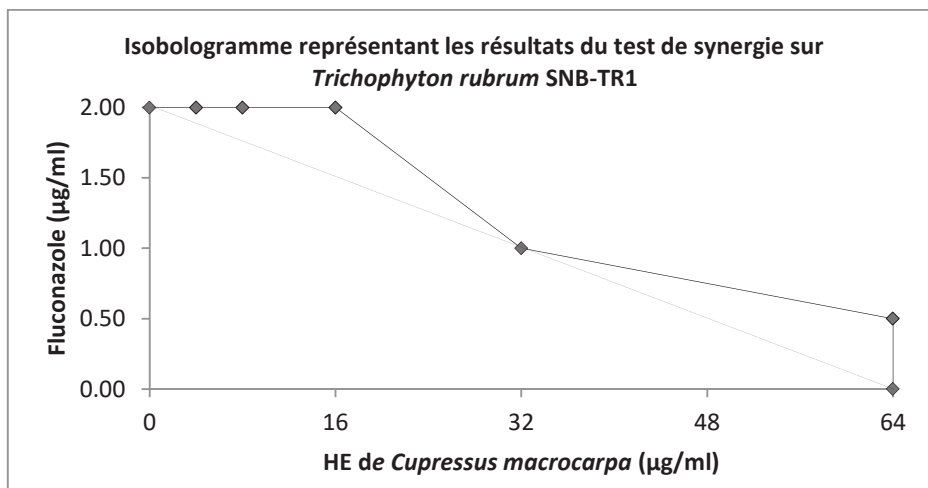
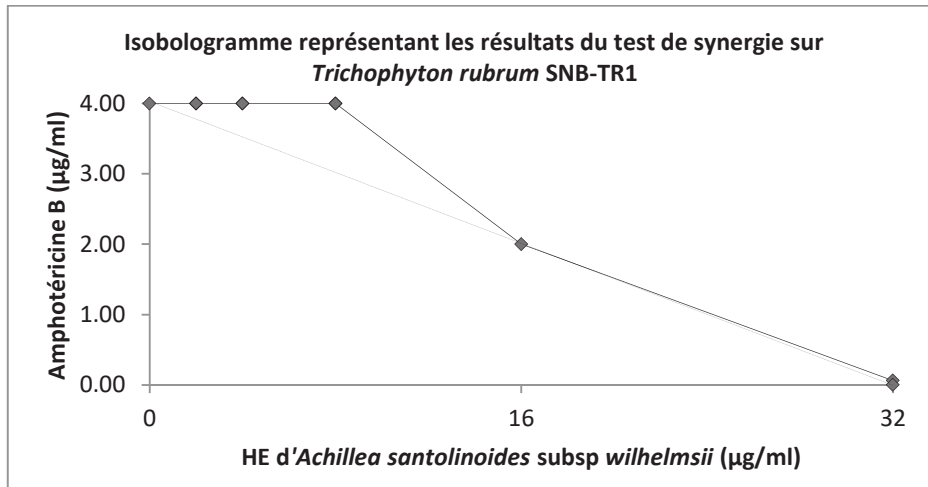
	SARM ATCC 33591	<i>T. mentagrophytes</i> SNB-TM1	<i>T. soudanense</i> SNB-TS1	<i>T. violaceum</i> SNB-TV1	<i>T. tonsurans</i> SNB-TT1
<i>Abies cilicica</i>		64	32	32	64
<i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i>	128	32	16	16	16
<i>Cupressus macrocarpa</i>		64	32	32	64
<i>Hypericum scabrum</i>		32	32	32	64
<i>Laurus nobilis</i> (fruits)		64	32	16	32
<i>Micromeria mirtifolia</i>		128	32	128	64
<i>Origanum majorana</i>		128	128	128	128
<i>Salvia multicaulis</i> (région Zahle)	128	64	32	8	64
<i>Achillea argentea</i>		256	64	64	64
Témoins positifs	1 ^a	1 ^b	2 ^c	2 ^c	4 ^c

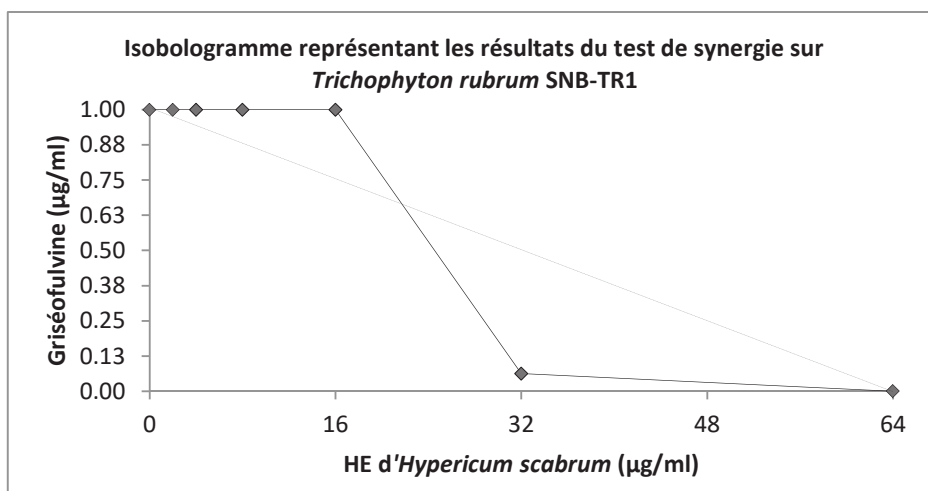
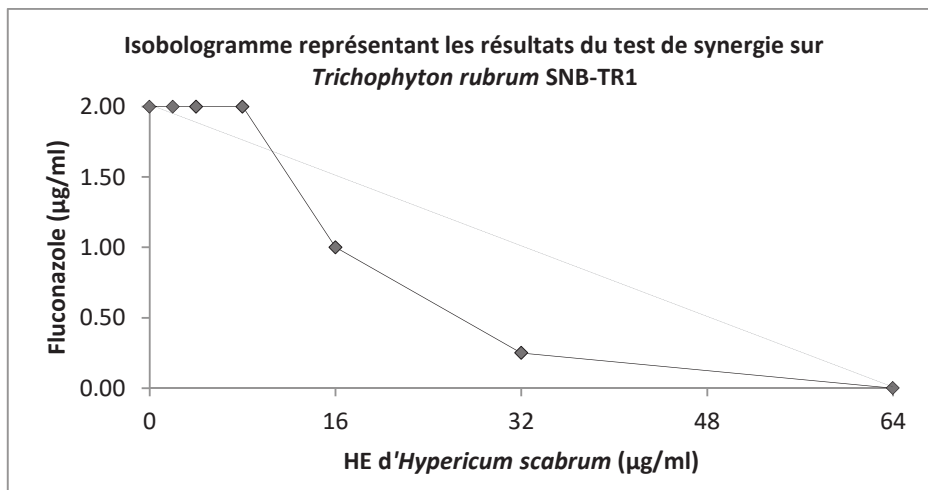
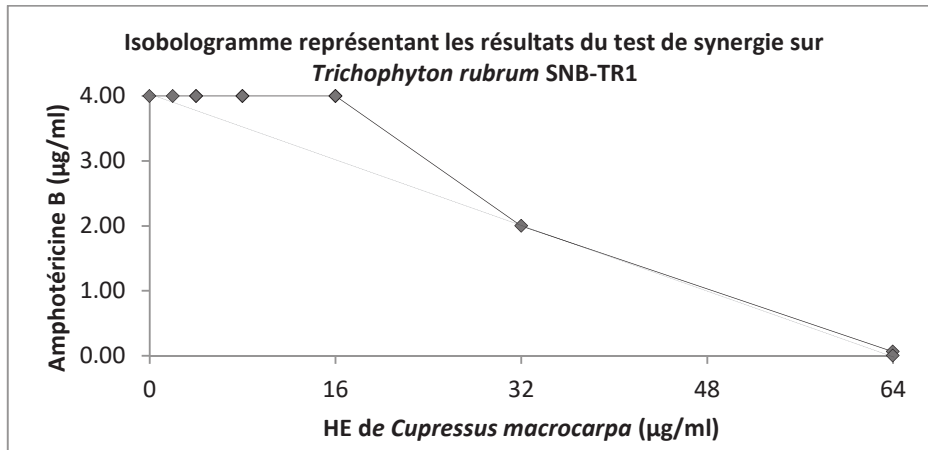
^a Vancomycine ; ^b Itraconazole ; ^c Fluconazole

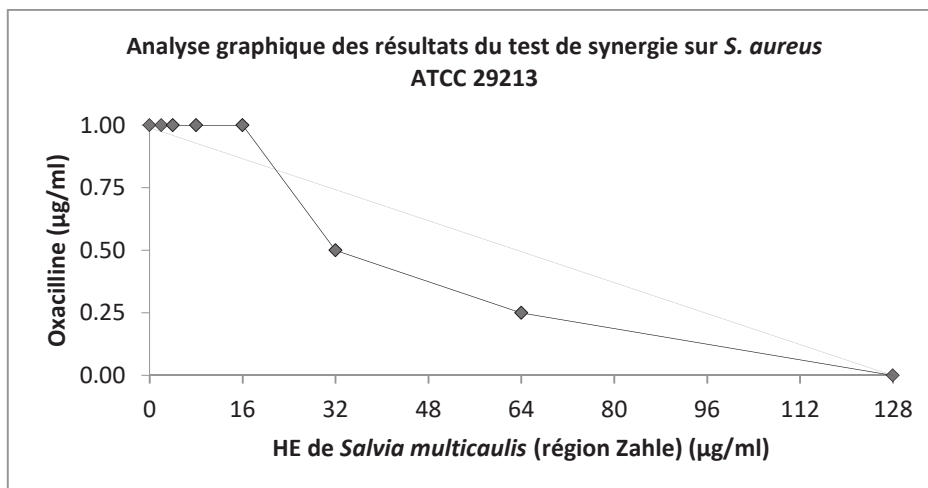
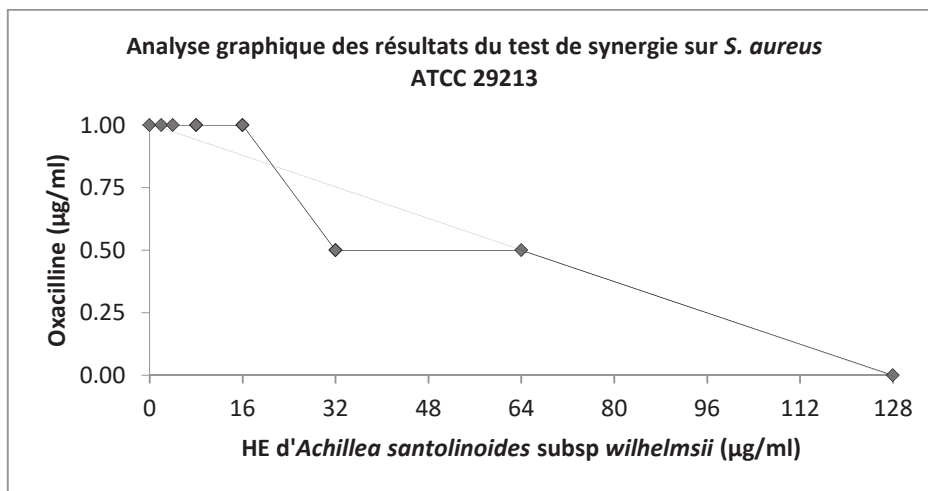
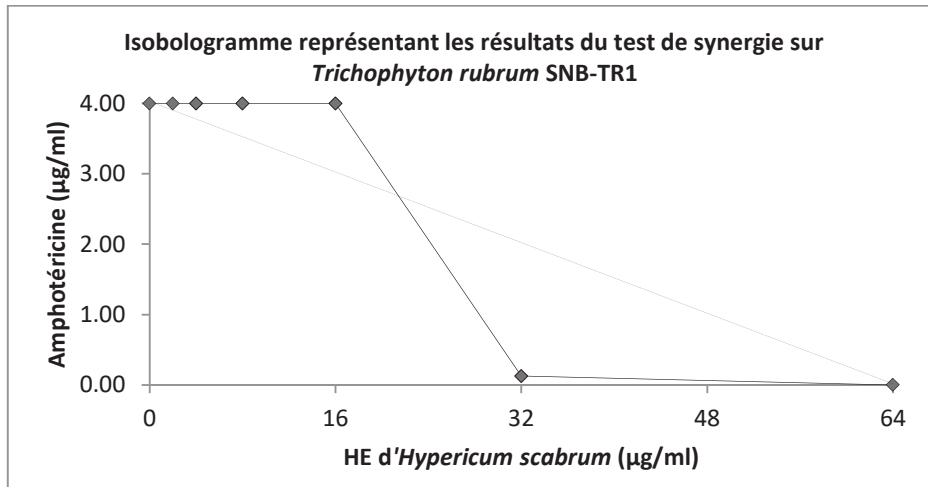
3. Annexe 3 : Isobologrammes représentant les résultats des tests de synergie des combinaisons des huiles essentielles les plus actives avec des antimicrobiens commerciaux

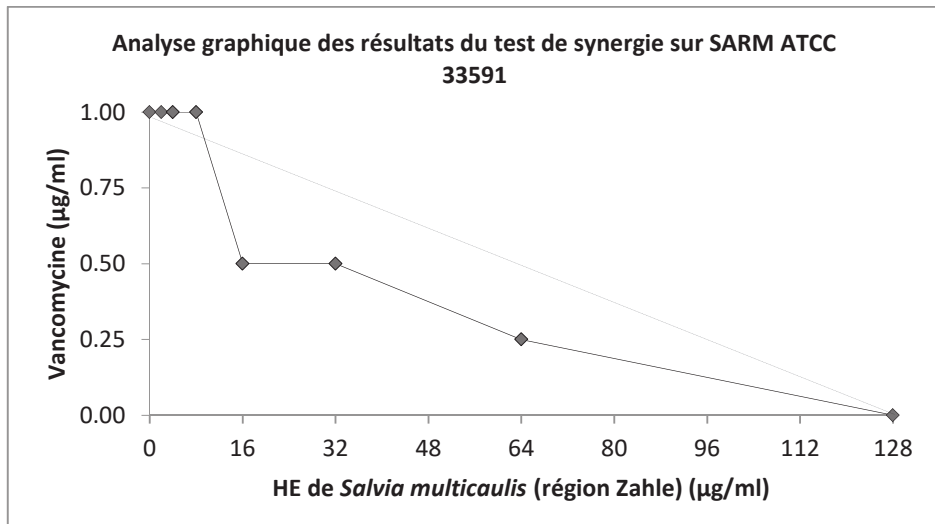
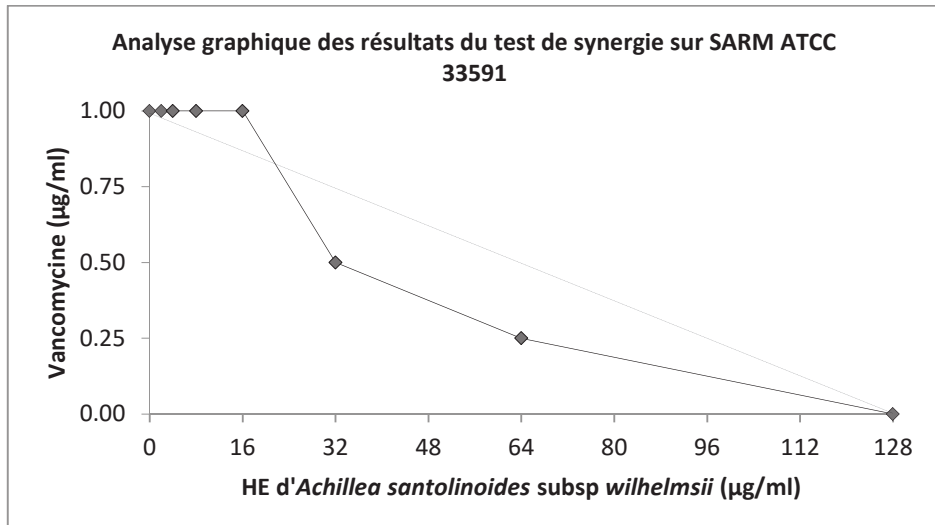












4. Annexe 4 : Quantification des résultats des tests de synergie qui n'ont pas fait l'objet d'une publication ou d'un projet de publication

Tableau 3 : Résultats des tests de synergie des combinaisons des huiles essentielles les plus actives avec des antifongiques commerciaux, sur *Trichophyton rubrum* SNB-TR1

Combinaison		HE	Antifongique	ICIF
HE d' <i>Abies cilicica</i> -Fluconazole	CMI _s	64	2	1,1
	CMI _c	64	0,25	
	CIF	1	0,125	
HE d' <i>Abies cilicica</i> -Griséofulvine	CMI _s	64	1	1
	CMI _c	32	0.5	
	CIF	0,5	0,5	
HE d' <i>Abies cilicica</i> -Amphotéricine B	CMI _s	64	4	2,1
	CMI _c	4	8	
	CIF	0,0625	2	
HE d' <i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i> -Fluconazole	CMI _s	32	2	1
	CMI _c	16	1	
	CIF	0,5	0,5	
HE d' <i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i> -Griséofulvine	CMI _s	32	1	0,6
	CMI _c	16	0,125	
	CIF	0,5	0,125	
HE d' <i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i> -Amphotéricine B	CMI _s	32	4	1
	CMI _c	32	0,0625	
	CIF	1	0,02	
HE de <i>Cupressus macrocarpa</i> -Fluconazole	CMI _s	64	2	1,2
	CMI _c	64	0.5	
	CIF	1	0,25	
HE de <i>Cupressus macrocarpa</i> -Griséofulvine	CMI _s	64	1	0,6
	CMI _c	4	0,5	
	CIF	0,0625	0,5	
HE de <i>Cupressus macrocarpa</i> -Amphotéricine B	CMI _s	64	4	1
	CMI _c	64	0,0625	
	CIF	1	0,016	

CMI_c : CMI de l'HE ou de l'antifongique seul (en µg/ml) ; CMI_s : CMI de l'HE ou de l'antifongique dans la combinaison la plus efficace en cas de synergie et celle de la combinaison la moins efficace en cas d'antagonisme (en µg/ml) ; CIF : Concentration Inhibitrice Fractionnaire ; ICIF : Indice de CIF

Tableau 4 : Résultats des tests de synergie des combinaisons des huiles essentielles les plus actives avec l'oxacilline sur *S. aureus* ATCC 29213

Combinaison		HE	Oxacilline	ICIF
HE d' <i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i> -Oxacilline	CMI _s	128	1	0,7
	CMI _c	32	0,5	
	CIF	0,25	0,5	
HE de <i>Salvia multicaulis</i> (région Zahle)-Oxacilline	CMI _s	128	1	0,7
	CMI _c	32	0,5	
	CIF	0,25	0,5	

CMI_c : CMI de l'HE ou de l'oxacilline seul (en µg/ml) ; CMI_c : CMI de l'HE ou de l'oxacilline dans la combinaison la plus efficace (en µg/ml) ; CIF : Concentration Inhibitrice Fractionnaire ; ICIF : Indice de CIF

Tableau 5 : Résultats des tests de synergie des combinaisons des huiles essentielles les plus actives avec des antibiotiques conventionnels sur SARM ATCC 33591

Combinaison		HE	Antibiotique	ICIF
HE d' <i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i> -Oxacilline	CMI _s	128	> 16	
	CMI _c	128	> 16	
	CIF	1		
HE d' <i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsii</i> -Vancomycine	CMI _s	128	1	0,7
	CMI _c	32	0,5	
	CIF	0,25	0,5	
HE de <i>Salvia multicaulis</i> (région Zahle)-Oxacilline	CMI _s	128	> 16	
	CMI _c	128	> 16	
	CIF	1		
HE de <i>Salvia multicaulis</i> (région Zahle)-Vancomycine	CMI _s	128	1	0,6
	CMI _c	16	0,5	
	CIF	0,125	0,5	

CMI_c : CMI de l'HE ou de l'antibiotique seul (en µg/ml) ; CMI_c : CMI de l'HE ou de l'antibiotique dans la combinaison la plus efficace (en µg/ml) ; CIF : Concentration Inhibitrice Fractionnaire ; ICIF : Indice de CIF

5. Annexe 5 : Résultats des tests de cytotoxicité

Tableau 6 : Résultats des tests de cytotoxicité sur les lignées cellulaires MRC5, des huiles essentielles qui ont été actives (CMI $\leq$ 128 $\mu\text{g/ml}$) sur au moins un des pathogènes testés

HEs	CI ₅₀	IS (<i>S. aureus</i>)	IS (<i>T. rubrum</i>)
<i>Abies cilicica</i>	7		0,1
<i>Achillea santolinoides</i> subsp <i>wilhelmsi</i>	14	0,1	0,4
<i>Cupressus macrocarpa</i>	11		0,2
<i>Hypericum scabrum</i>	10		0,2
<i>Laurus nobilis</i> (fruits)	16		0,3
<i>Micromeria mirtifolia</i>	12		0,1
<i>Origanum majorana</i>	12		0,1
<i>Salvia multicaulis</i> (région Zahle)	12	0,1	0,2
<i>Achillea argentea</i>	10		0,2

CI₅₀ : Concentration (en $\mu\text{g/ml}$) Inhibant 50 % de la croissance cellulaire ; IS : Indice de sélectivité