



Article original

Production et caractérisation de l'huile essentielle de *Ballota hirsuta* Benth. en provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale)

Production and characterization of essential of *Ballota hirsuta* Benth. from Tessala mount (western Algeria)

Kheira KECHAR, Ali LATRECHE, Samira MAHROUG

Laboratoire de biodiversité végétale : conservation et valorisation, Faculté des sciences, Université Djillali Liabès, Sidi Bel Abbès, 22000, Algérie. Courriel : kechark@yahoo.fr (Auteur correspondant).

RÉSUMÉ

Les huiles essentielles de *Ballota hirsuta* Benth. plante aromatique poussant à l'état spontané dans les monts de Tessala (Algérie occidentale), ont été extraites par l'entraînement à la vapeur d'eau. Les analyses quantitatives des huiles essentielles ont montré une quantité plus au moins élevée dans la station 02 versant nord, qui avait atteint au maximum 0.53 %. Le dosage de quelques paramètres physiques (densité relative, pouvoir rotatoire, miscibilité à l'alcool) de l'huile essentielle montre de bonnes qualités physiques. Le test antimicrobien de cette huile essentielle a permis de mettre en évidence son fort potentiel antibactérien, *E. coli* (ATCC 25922) présente la sensibilité la plus significative.

MOT-CLÉS : *Ballota hirsuta* Benth., huiles essentielles, activité antibactérienne

ABSTRAT

Essential oils of *Ballota hirsuta* Benth, an aromatic plant growing spontaneously in Tessala area (western Algeria), were extracted by steam distillation. The quantitative analysis of this essential oil showed an average maximum yield of 0.53 % in station 02 Northern side. The dosage of the physical parameters (relative density, rotational power, miscibility to the alcohol) has allowed to conclude that the essential oil has a good quality. Antimicrobial test of this essential oil permitted to make in evidence its strong antibacterial potential. *E. coli* ATCC 25922 presented a very significant sensitivity.

KEY-WORD: *Ballota hirsuta* Benth., essential oils, antibacterial activity.

INTRODUCTION

A côté des antibiotiques connus, différentes plantes aromatiques sont utilisées depuis longtemps dans la lutte contre les maladies infectieuses (tuberculose, tétanos) [1], causées par les bactéries et les champignons et qui affectent des millions de personnes dans le monde entier [2]. Les plantes médicinales et aromatiques pourraient permettre le traitement ou la prévention de maladies chroniques et/ou graves, et résoudre le problème de la résistance

bactérienne vis-à-vis des agents antibactériens actuels. Des études récentes ont montré que les huiles essentielles (HE) et leurs constituants présentent un potentiel important en tant qu'agents antimicrobiens et dans plusieurs domaines industriels et médicaux [3]. C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail. En effet, notre étude a porté sur la ballote hirsute (*Ballota hirsuta* Benth.) une espèce aromatique appartenant à la famille des lamiacées. Le rendement et les analyses qualitatives de l'huile



essentielle ont été précisés et l'activité antibactérienne a été étudiée.

PARTIE EXPÉRIMENTALE :

1- Matériel végétal :

La ballote hirsute est une plante vivace de la famille des lamiacées caractérisée par des tiges ligneuses et velues de 24 à 60 centimètres de longueur, des feuilles ovales ou arrondies à fortes nervures et des fleurs de couleur rose ou pourpre en glomérules denses à l'aisselle des feuilles [4]. La plante évolue dans un matorral à une altitude de 789 m à l'étage bioclimatique semi-aride à hiver frais. Les conditions climatiques régnant dans cette région se caractérisent par une amplitude thermique annuelle de 33°C (moyenne minimas de 2,5 °C et moyenne maximas de 35,5°C), une pluviométrie entre 335 et 409 mm/an, une humidité relative maximale de 77 % en hiver et minimale de 52 % en été [5].

La partie aérienne de la ballote hirsute a été récoltée en juillet 2011 dans la zone des monts de Tessala au niveau de deux stations : station 01 : Versant Sud (Altitude : 796 m) et station 02 : versant Nord (Altitude : 854m). Ce mont est situé à 15 km au nord-ouest de la ville de Sidi Bel Abbès (Algérie occidentale). Il fait partie de l'Atlas tellien ; son point culminant se trouve à 1061 m. Les feuilles récoltées sont lavées à l'eau courante ensuite séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière afin de préserver au maximum l'intégrité de ses molécules constitutives. Les échantillons ont été ensuite broyés et tamisés pour obtenir une structure granulaire homogène. La poudre ainsi obtenue est conservée dans des flacons en verre pour des analyses ultérieures.

2-Matériel bactérien :

Les souches bactériennes utilisées ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de département de biologie de la faculté des sciences (Universitaire de Sidi Bel Abbès, Algérie). Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24 h à l'obscurité à 37 °C. Les souches bactériennes utilisées sont des souches de références ATCC

(American Type Culture Collection) : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25922) et *Proteus mirabilis* ATCC 29906 (Tableau 1).

Tableau 1 : Souches bactériennes étudiées

Bactéries	Gram -	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
		<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	

3-Procédé d'extraction :

Seules les parties aériennes sont utilisées pour l'obtention des huiles essentielles. Nous avons appliqué la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau. Ce procédé d'extraction consiste à faire traverser par la vapeur d'eau une grille perforée remplie de 100g, les particules d'eau font éclater les cellules contenant l'essence et entraînent avec elle les molécules odorantes. A la sortie de la grille et sous pression contrôlée la vapeur d'eau enrichie d'huile essentielle traverse un serpentin (réfrigérant) où elle se condense. A la sortie de ce dernier, on recueille après 3 heures d'extraction le distillat. Celui-ci est généralement formé de deux phases non miscibles, une phase aqueuse la plus abondante, constituée d'eau, et une phase huileuse riche en huiles essentielles. Une fois le distillat récupéré, une décantation de celui-ci avec 03 essais de dichlorométhane est réalisée afin de séparer l'huile essentielle de l'eau. On ajoute du sulfate de magnésium ($Mg SO_4$) afin de débarrasser l'HE des dernières molécules d'eau. Ensuite le dichlorométhane est évaporé à l'aide d'un rotavapeur. L'huile essentielle recueillie est conservée à + 5°C [6]. Le rendement d'extraction de l'HE (R) est calculé par la formule suivante : $R (\%) = (m/m_0).100$, m : masse en gramme de l'huile essentielle, m_0 : masse en gramme de la matière végétale [7].



4-Analyses qualitatives :

Les analyses effectuées sur l'HE sont faites en conformité aux normes AFNOR [8]. Nous avons déterminé la densité relative (NF T75-111), pouvoir rotatoire (NF T 75-113) et la miscibilité à l'éthanol 95% (NF T75-101). Également des propriétés organoleptiques ont été déterminées concernant la couleur, l'odeur et l'aspect.

5-Procédures microbiologiques :

La technique utilisée est celle de l'aromatogramme, c'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des HE. On dépose des disques en papier imprégnés de l'huile essentielle à des concentrations différentes allant de 1/25v/v jusqu'à 1/100v/v préparées dans le Tween 80, sur une gélose (Mueller Hinton) uniformément ensemencée par chacune des souches bactérienne dont on veut étudier la sensibilité à l'HE. L'ensemencement se fait par stries à l'aide d'une anse de platine calibrée afin de prélever le même volume de l'inoculum en suspension dans l'eau physiologique. Les résultats sont exprimés par la mesure du diamètre des halos d'inhibition en mm autour des disques [9].

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1-Teneur en huile essentielle :

Le rendement moyen en huile essentielle obtenu par l'extraction des feuilles de *Ballota hirsuta* Benth. est de $0.32 \pm 0,02\%$ pour la station 01 (Versant Sud 796 m) et de $0.53 \pm 0,03\%$ dans la station 02 (versant Nord à 854m) (figure 1). Il est relativement élevé par rapport à certaines plantes aromatiques de la même famille.

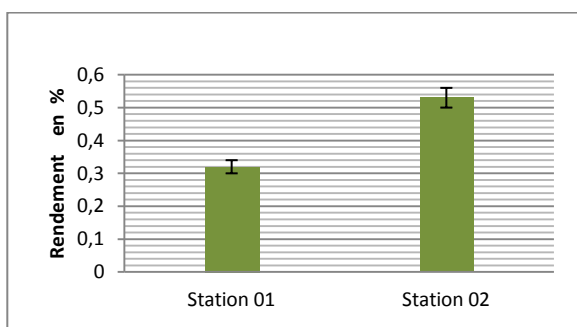


Figure 1 : Rendement en huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur dans les deux stations

2-Propriétés organoleptiques et indices physiques :

Les propriétés organoleptiques de l'HE des feuilles de *Ballota hirsuta* Benth montrent que c'est un liquide visqueux, huileux, de couleur jaune et présentant une odeur spécifique. Cette huile est caractérisée par une densité ($0.83 \pm 0,02$), et un pouvoir rotatoire $\alpha = + 0.14$ D, ce qui montre qu'elle est dextrogyre. Pour la miscibilité à l'alcool, nous constatons qu'il faut ajouter trois volumes d'éthanol 95% à un volume d'huile pour obtenir un mélange parfaitement limpide.

Tableau 2 : Analyses qualitatives de l'huile essentielle de *Ballota hirsuta* Benth.

Indices physiques		Propriétés organoleptiques	
Densité relative	$0.83 \pm 0,02$	Odeur	Spécifique à Lamiacées
miscibilité à l'alcool	1/3		
Pouvoir rotatoire	$\alpha = + 0.14$ D	Couleur	Jaune

3-Lecture des résultats microbiologiques :

Les diamètres des zones d'inhibitions de chaque concentration ont été exprimés sur la base de trois mesures (moyenne \pm l'écart type). Les résultats ont montré que cet extrait présente une activité inhibitrice variable vis-à-vis des souches testées. *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* se montrent très sensibles en présentant respectivement les diamètres des zones d'inhibition 14 ± 2 , 12 ± 1 , 11 ± 2 , $8,5 \pm 0,5$ et 13 ± 2 , 10 ± 2 , $9 \pm 1,5$, 8 ± 1 , 7 ± 1 mm. Cependant *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* présentent une faible sensibilité avec les diamètres des zones d'inhibition 12 ± 1 , 9 ± 2 , $8,5 \pm 0,5$, 7 ± 1 mm et 10 ± 2 , 9 ± 1 , 7 ± 1 mm.

Tableau 3 : Sensibilité et résistance des souches bactériennes à l'huile essentielle de *Ballota hirsuta* Benth.



Concentration (V/V)	1/25	1/50	1/75	1/100	T
Bactéries					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25922	-	-	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	-	-	+	+	+

- : Inhibition, + : Croissance,

T : Témoin (Tween 80).

Une absence de la croissance de toutes les souches en présence de l'HE à des dilutions de 1/25 et 1/50 a été observée. Le plus grand diamètre d'inhibition est obtenu dans le cas de la souche d'*Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*. Ces deux souches sont donc les plus sensibles à cette HE. Nous avons aussi remarqué que plus la concentration est élevée, plus la zone inhibition semble grande (Figure 2).

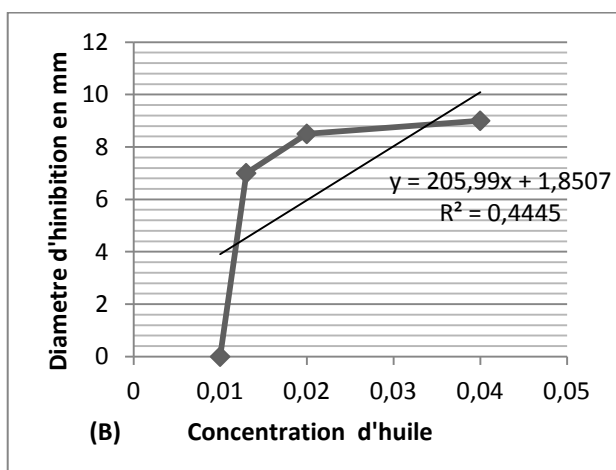
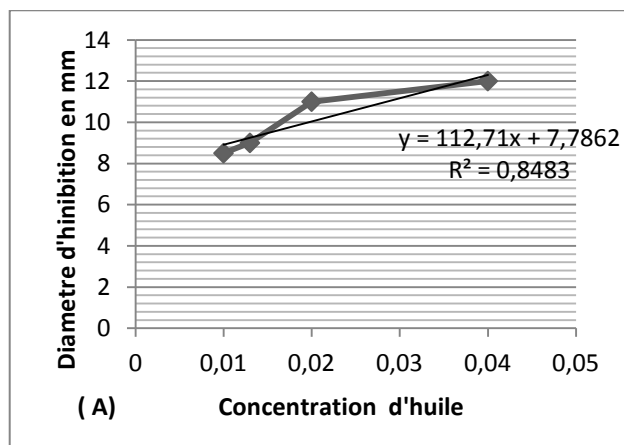
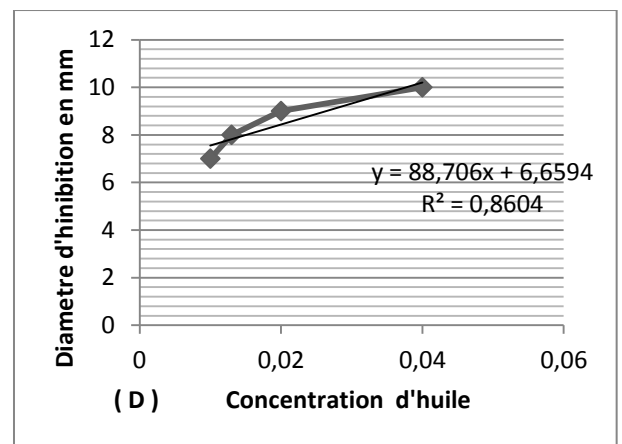
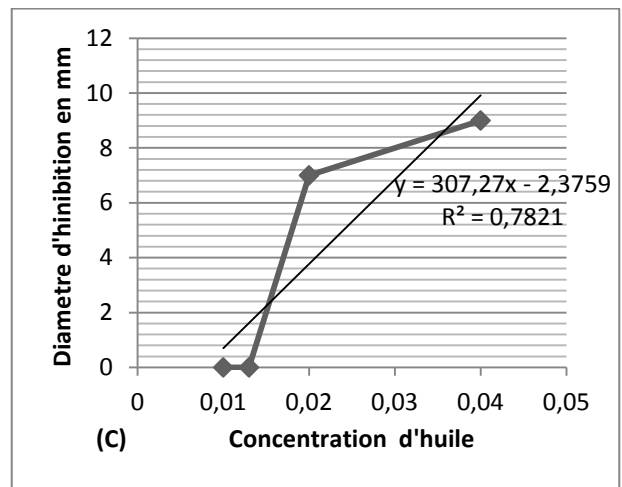


Figure 2 : Variation des diamètres d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'HE de la ballote hirsute

A : *Escherichia Coli*, B : *Staphylococcus aureus*, C : *Pseudomona aeruginosa*, D : *Proteus mirabilis*

DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent que les teneurs en huile essentielle varient considérablement d'une station à une autre selon l'endroit où la plante pousse. Il a été signalé par des travaux antérieurs que la quantité des métabolites secondaires des espèces végétales dépend essentiellement de leur origine [11]. Certains facteurs comme, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales et la localisation géographique affectent considérablement la teneur des métabolites [12]. De plus, la teneur dépend aussi d'un certain nombre de facteurs intrinsèques



(génétique) et extrinsèques (les conditions de stockage) [13]. Une huile essentielle de bonne qualité a une densité relative et un pouvoir rotatoire plus élevés, ce qui se rapproche de nos résultats.

L'activité antimicrobienne de l'HE de la ballote hirsute est très importante vis-à-vis des souches étudiées, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce comportement n'est pas surprenant car cette dernière possède une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides. En effet cette résistance est associée à la nature de sa membrane externe. Certains travaux montrent l'effet inhibiteur d'extraits de *Ballota* (Hispanolone) contre les bactéries Gram- et Gram+ [14].

Le mode d'action de certaines molécules actives des HE a été décrit dans littérature ; le Carvacrol et le thymol semblent être capables d'augmenter la perméabilité membranaire en détruisant la membrane externe des bactéries Gram- [15] ; l'action du thymol a été étudiée dans des travaux antérieurs, ce composé entraîne une perte du matériel intracellulaire [16]. Les alcools terpéniques sont particulièrement actifs contre les cellules microbiennes car ces extraits possèdent une grande solubilité dans les milieux aqueux et ils provoquent d'importants dégâts sur les parois cellulaires des microorganismes [17].

Les bactéries ont été plus vulnérables à l'huile essentielle que les champignons. Ce résultat est à rapprocher du fait que les terpénols sont abondants par rapport aux hydrocarbures terpéniques. En effet, il a été signalé que les terpénols sont plus efficaces contre les bactéries

que contre les champignons. Le totarol (phénol diterpénique) en particulier est connu par son efficacité antibactérienne très élevée [18].

Certaines études ont montré que l'activité antimicrobienne, antivirale, insecticide, larvicide et ovicide des huiles essentielles est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément. Les composants minoritaires ont un rôle déterminant dans l'activité microbienne, ils pourraient avoir un effet synergétique avec ces dernières [19]. Il est décrit dans la littérature l'existence d'une synergie entre le carvacrol et son précurseur biologique, le *p*-cymène : la présence de *p*-cymène permet au carvacrol de pénétrer plus facilement dans la cellule de la souche bactérienne [10].

CONCLUSION

La présente étude préliminaire menée sur l'huile essentielle de la ballote hirsute nous a permis de constater que les feuilles de cette plante referment des teneurs en huile essentielle qui varient d'une station à une autre selon les conditions écologiques. L'étude de l'huile essentielle par les analyses qualitatives indique que cet extrait possède une bonne qualité. Les essais du pouvoir antibactérien montrent la présence des souches sensibles comme *Escherichia coli*. Cette étude a permis la mise en évidence de l'activité biologique de l'HE de la ballote hirsute qui permettrait son exploitation dans les domaines pharmaceutique et cosmétique, des essais complémentaire sont cependant nécessaires et devront confirmer les performances mises en évidence.

REFERENCES

[1]: Siddiqui Y.M., Ettayebi M., Haddad A.M., Al-Ahdal M.N. Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type 1 and Newcastle disease virus. *Med. Sci.Res.*, 1996, 24, 185-186.
[2]: Persidis A. Antibacterial and antifungal drug discovery. *Nature Biotechnol.*, 1999, 17, 1141-1142.

[3]: Baser K.H.C., Demirci B., Demirci F., Koçak S., Akinci Ç., Malyer H., Güleriyüz G. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*. - *Planta Med.*, 2002, 68(10), 941-943.
[4]: Quezel .P et S. Santa, Nouvelle flores d'Algérie et des régions désertiques méditerranéennes Ed centre national de la recherche

scientifiques Paris France Tome II 1963.

[5]: Office National de Météorologie. Données climatiques de 1970 à 2012. 2013Oran.

[6]: Bruneton J. *Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie. Techniques et Documentation-Lavoisier, Paris1987.*



REFERENCES

- [7]: AFNOR, Recueil de normes françaises des huiles essentielles, AFNOR, Paris, 2000.
- [8]: AFNOR, Les huiles essentielles vocabulaire-1ere liste1998.
- [9]: Pibiri M.C., Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse no3311, polytechnique fédérale de lausanne 2006.
- [10]: Dorman H., Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil, *Journal of Applied Microbiology.*, 2000, 88, 308-316.
- [11]: Ebrahimzadeh M. A., Pourmmorad F., Hafezi S. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish journal of biology.* 2008, 32, 43-49.
- [12]: Park, H. J. et Cha, H. C. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape *Kyoho.Korean.* *Journal of biological society.* 2003, 7, 327-330.
- [13]: Falleh H., Ksouri., Chaieb R., Karray-Bouraoui K., Trabelsi N., Boulaaba N., Abdelly M., C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.*, 2008,331, 372-379.
- [14]: Citoglu G., Tanker M., Sever B., Englert J., Anton R., Altanlar N. Antibacterial activities of diterpenoids isolated from *Ballota saxatilis* subsp. *Planta Medica.*, 1998, 64(5), 484-485.
- [15] – Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 3590-3595.
- [16]: Rasooli I., Rezaei M.B., Allameh A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Infect. Dis.*, 2006, 10, 236-241.
- [17]: Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. - *Flavour Fragr. J.*, 1999, 14(5), 322-332.
- [18]: Sadyrbekov D.T., Suleimenov E.M., Tikhonova E.V., Atazhanova G.A., Tkachev A.V., Adekenov S.M. Component composition of essential oils from four species of the genus *Achillea* growing in Kazakhstan. - *Chem. Nat. Comp.*, 2006, 42(3), 243-245.
- [19]: Burt S.A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review, *International journal of food microbiology.*, 2004, 49, 223-253.