

COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DE L'EXTRAIT NON VOLATIL ET DES HUILES ESSENTIELLES DE LA RUE DES MONTAGNES (*Ruta montana* L.)

Hazzit M.^{1*}, Benchabane A.¹, Baaliouamer A.^{2,3}, Alloun K.¹, Kaci M.¹

¹ Département de Technologie Alimentaire, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El-Harrach (ENSA), Alger

² Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), Faculté de Chimie, Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle, BP 32 El Alia, Bab Ezzouar, Alger

³ Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC), BP 248 RP 16004, Alger

RÉSUMÉ

Ce travail vise l'étude de la composition chimique et de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique non volatil et de l'huile essentielle de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.). L'huile essentielle extraite par hydrodistillation a été analysée par chromatographie en phase gazeuse seule (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). L'extrait de *Ruta montana* obtenu par extraction solide/liquide par Soxhlet a été analysé en termes de dosage des phénols totaux et des flavonoïdes. L'huile essentielle de *R. montana* est constituée essentiellement par la 2-Undécanone (94%) et la 2-décane (3.3%). Les résultats relatifs à l'étude de l'activité antimicrobienne sur deux bactéries Gram + (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*), deux bactéries Gram – (*Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*) et une levure (*Candida albicans*) ont montré une action et un degré de sensibilité variables.

Mots Clés : Huile essentielle, *Ruta montana*, composition chimique, activité antimicrobienne.

SUMMARY

This work aim to study the chemical composition and the antimicrobial activity of the non-volatile ethanolic extract and the essential oil of *Ruta montana* L. The essential oil extracted by hydrodistillation was analyzed by GC and GC-MS. The extract obtained by liquid-solid extraction by Soxhlet apparatus was analyzed in terms of total phenols and flavonoids contents. The essential oil of *Ruta Montana* is essentially constituted by 2-Undecanone (94%) and 2-décane (3.3%). The results relative to antimicrobial activity of two Gram + bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*), two Gram- bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*) and one yeast (*Candida albicans*) showed variable degrees of sensitivity and efficiency.

Key Words : Essential oil, *Ruta montana*, chemical composition, antimicrobial activity.

INTRODUCTION

Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent des applications dans divers domaines tels que les industries pharmaceutiques, la médecine, les industries cosmétiques et l'agroalimentaire.

Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches *in vivo et in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles. L'évaluation de leurs propriétés biologiques comme antioxydants et antimicrobiens demeure une tâche très intéressante et très utile.

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes sont principalement dues à la fraction d'huile essentielle et aux composés phénoliques contenus dans les plantes (Richard, 1992 ; Deans *et al.*, 1987 ; Hazzit *et al.*, 2009).

Ruta montana (*Rutaceae*) est une plante médicinale méditerranéenne bien connue qui pousse à l'état spontané dans les rocailles et les pâturages du Tell. C'est une espèce commune dans les zones montagneuses jusque sur l'Atlas saharien. Elle est connue sous le nom vernaculaire « *Fidjela el djebeli* ». C'est une plante vivace, herba-

cée de la famille des rutacées atteignant environ 1 mètre. Les feuilles sont glauques finement découpées en segments linéaires. Les capsules sont globuleuses 3,5 x 4 mm à 4 loges obtuses très brièvement pédicellées. Fleurs petites 5-6 mm à pétales denticulés sur les marges (Quezel et Santa, 1963). Elle a l'inconvénient de dégager une odeur forte et très désagréable.

A petite dose, *Ruta montana* des vertus toniques et stimulantes qui facilitent la digestion et possède des propriétés abortives. C'est un répulsif pour les insectes, notamment les pucerons.

Bien que *Ruta montana* soit reconnue comme plante vénéneuse, elle est utilisée en médecine populaire, comme emménagogue, antispasmodique, antiépileptique, vermifuge et sudorifique. Son mode d'utilisation en usage interne est l'infusion de la plante entière ou des sommités fleuries à raison de 1 à 2 grammes au maximum par tasse d'eau bouillante. En usage externe, on l'emploie comme antirhumatismale et surtout comme antiseptique sur les plaies et les ulcérations, de même qu'en bains de bouche pour soigner les affections gingivales (Alloun et Kaci, 2010).

Dans le but de contribuer à la valorisation de la flore Algérienne en vue d'identifier de nouvelles substances potentiellement intéressantes sur les plans biologique et thérapeutique, nous avons procédé à l'étude *in vitro* de l'effet de l'extrait éthanolique non volatil et des huiles essentielles de la rue des montagnes (*Ruta montana* L) sur un ensemble de bactéries pathogènes.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 Matériel végétal

La plante *Ruta montana* est récoltée dans la région de Tablat (W. Médéa). La cueillette des fleurs, tiges et feuilles a été effectuée au mois de Juin 2012.

2 Protocole expérimental

2.1 Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle à partir des parties aériennes de la plante a été réalisée par hydrodistillation au moyen d'un appareil de type Clevenger. La durée de distillation est de trois heures. L'enlèvement de l'eau de l'huile essentielle est effectué par ajout du sulfate de sodium anhydre. Enfin, l'huile obtenue est stockée à 4 °C dans l'obscurité.

2.2/ Souches testées

Les bactéries retenues pour cette étude sont : *Staphylococcus aureus* (ATCC : 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC : 9372), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC : 9027), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC : 4352) et *Candida albicans* (ATCC : 24433).

3 Méthodes analytiques

3.1 Chromatographie en Phase Gazeuse

Trois analyses chromatographiques ont été réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Hewlett-Packard (série HP 6890), équipé d'une colonne capillaire en silice fondue de type HP5-MS de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre et 0,25 mm d'épaisseur de film. Il est aussi équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID)

réglé à 260°C et alimenté par un mélange de gaz H₂/air et d'un injecteur split-splitless réglé à 250°C. Le mode d'injection est Split (rapport de fuite : 1/20). Le gaz vecteur utilisé est l'azote avec un débit de 0,5mL/min. La température de la colonne est programmée à 60°C pendant 8 min. puis augmentée jusqu'à 280°C à raison de 2°C/min. L'appareil est piloté par un système informatique de type HP "ChemStation", gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

3.2 Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)

L'huile essentielle a été analysée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard (série HP 6980) couplé avec un spectromètre de masse (série HP 5973A). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70 eV. La température de la colonne est identique à celle utilisée pour la CPG, et est programmée avec les mêmes conditions citées précédemment pour la chromatographie seule. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 0,5 ml/min. Le mode d'injection est Split (rapport de fuite : 1/20). L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectres de masse NIST 2005 et Wiley 7N.

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs indices de Kovats (IK) déterminés par rapport à une série de n-alcane C₉-C₂₀ et sur leurs spectres de masse. Les pourcentages des constituants sont déterminés par rapport aux surfaces des pics obtenus par la CPG-FID.

3.3 Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été réalisé par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). En milieu basique, le réactif de Folin Ciocalteu oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques présents dans l'échantillon. Les produits de réduction (oxydes métalliques W_8O_{23}/Mo_8O_{23}) de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de phénols présents dans l'échantillon. Une courbe étalon a été réalisée avec l'acide gallique dans les mêmes conditions que l'échantillon. Le résultat est exprimé en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g matière).

3.4 Dosage des flavonoïdes

La méthode au trichlorure d'aluminium a été employée pour la détermination de la teneur totale en flavonoïdes (Lamaison et Carnet, 1990). Une courbe étalon a été réalisée avec la quercétine dans les mêmes conditions que l'échantillon. Le résultat est exprimé en mg équivalent quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g matière).

3.5 Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait éthanolique a été testée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose appelés aromatoigrammes. Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des

antibiogrammes «Pharmacopée Européenne, 2002 ». Le mode opératoire quant à lui, a été approuvé par la directrice du laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL. La méthode de diffusion sur milieu gélosé a été utilisée par plusieurs chercheurs (Chao *et al.*, 2000; Ozcan *et al.*, 2003). La méthode des aromatoigrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose (dans notre cas: disque de 9 mm de diamètre) imprégné d'une quantité bien définie de l'huile essentielle ou de l'extrait à tester, à la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri et ensemencée avec le micro-organisme testé. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone claire autour du disque, appelée: zone d'inhibition.

3.5.1 Préparation de la première couche de milieu

On fait fondre les milieux Mueller-Hinton (MH) et Sabouraud (SAB) dans un bain marie à 95°C, puis on verse aseptiquement une première couche des deux milieux dans des boîtes Petri de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte, on laisse refroidir et solidifier sur paillasse.

3.5.2 Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 18h pour les bactéries et de 48h pour les levures, on réalise des suspensions troubles en prélevant 8 à 10 colonies bien isolées et identiques, qu'on dépose dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex. On réalise une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre en estimant la transmit-

tance qui doit être comprise entre 22% et 32% pour les bactéries et entre 2% et 3% pour les levures et cela à une longueur d'onde de 620 nm.

3.5.3 Préparation de la deuxième couche du milieu

On fait fondre les deux milieux MH et SAB, on les laisse refroidir jusqu'à une température de 45°C et on transvase 50 ml de chaque milieu dans des flacons stériles. Onensemence les milieux avec 200 µl de chaque suspension et on agite manuellement; puis on dépose rapidement 4 ml de chaque milieuensemencé sur la surface de la première couche (couche support) de gélose solidifiée. On étale immédiatement la couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme et on laisse solidifier sur la pailleasse.

3.5.4 Les huiles essentielles et les extraits végétaux utilisés

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, les huiles essentielles utilisées sont à l'état pur, alors que les extraits secs sont dilués pour obtenir des extraits liquides qu'on peut utiliser dans la technique de l'aromatogramme. La préparation de l'extrait dilué se fait en prélevant 1g d'extrait sec et en le complétant jusqu'à 5g avec de l'éthanol absolu; puis on agite jusqu'à homogénéisation totale de la solution.

3.5.5 Dépôt des disques

À l'aide d'une micropipette, et en utilisant des cônes stériles, on prélève 20 µl d'huile essentielle pure ou d'extrait dilué, puis on dépose chaque quantité prélevée sur le disque posé préalablement à l'aide d'une

pince stérile sur la surface de la géloseensemencée.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent que le rendement en huile essentielle est de 0,8% (ml/100g). Par contre, selon Kambouche et al., (2008), l'hydrodistillation des parties aériennes de cette plante, provenant de la région d'Oran, a donné un rendement en huile essentielle de 1,63%. Par ailleurs, un rendement faible de l'ordre de 0,4% a été obtenu par Soleimani et al., (2009) en utilisant *Ruta graveolens* L. et en utilisant la même technique d'extraction. Enfin, Dob et al., (2008), le rendement en huile essentielle des parties aériennes de *Ruta chelepis* était de 0,27%. Par conséquent, notre échantillon a fourni un rendement intermédiaire par rapport à ceux de la littérature. Les conditions édaphoclimatiques, la période de récolte (floraison ou état végétatif) ainsi que les conditions d'entreposage sont souvent considérées comme responsables des variations de ces rendements en huiles essentielles.

D'autre part, le tableau 1 résume quelques caractéristiques physiques.

Tableau 1 : Caractéristiques physiques de l'huile essentielle de *Ruta montana*.

Paramètre	Caractéristique
Aspect :	Liquide mobile
Couleur :	Jaune pâle
Odeur :	Désagréable et prononcée
Densité :	0,8042g/ml
Indice de réfraction :	1,4306

L'analyse par CPG seule et CPG/SM de l'huile essentielle de *Rutamontanaa* abouti à l'identification et à la quantification de 13 composés représentant 99.9% de la totalité des pics avec la 2-undécanone (94%) comme composé principal (tableau 2). Les cétones (98.8%) constituent la classe de composés la plus dominante. La figure 1 représente le chromatogramme des constituants de l'huile analysée.

Tableau 2 : Composition chimique (%) de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation à partir des parties aériennes de *Ruta montana*.

N°	¹ Composés	² IK	%
1	α -Pinene	939	t
2	Camphene	951	t
3	2-Nonanone	1102	0.1
4	Nonanal	1105	0.2
5	Camphor	1145	t
6	Nortricyclene	1178	t
7	1-Nonanol	1215	t
8	2-Decanone	1192	3.3
9	2-Undecanone	1296	94
10	2-Dodecanol	1305	0.9
11	6-Dodecanone	1336	0.2
12	2-Dodecanone	1383	1.0
13	2-tridecanone	1502	0.2
	Composés identifiés (%)		99.9
	Hydrocarbures monoterpéniques		t
	Aldéhydes		0.2
	Cétones		98.8
	Alcools		0.9

¹ Composés classés par ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5MS ;

² Indices de rétention relatifs aux n-alcanes C9-C16 ; t : trace (<0.05%).

En outre, à titre de comparaison, le tableau 3 donne les teneurs en composés majoritaires d'un autre échantillon de *Ruta montana* et de quelques espèces du même genre (*Ruta* sp).

Tableau 3 : Comparaison entre les teneurs (en %) des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Ruta montana* et de quelques espèces du même genre.

	<i>R. montana</i> (Kambouche <i>et al.</i> , 2008)	<i>R. graveolens</i> (Soleimani <i>et al.</i> , 2009)	<i>R. chalepensis</i> (Dob <i>et al.</i> , 2008)	<i>R. corsica</i> (Oussalah <i>et al.</i> , 2010)	<i>R. montana</i> (Espèce étudiée, Tablat)
2-Undecanone	32.8	1.3	43.7	–	94.0
2-Decanone	–	–	1.96	0.5	3.3
2-Dodecanone	–	0.2	0.93	–	1.0

– : ($\leq 0.1\%$).

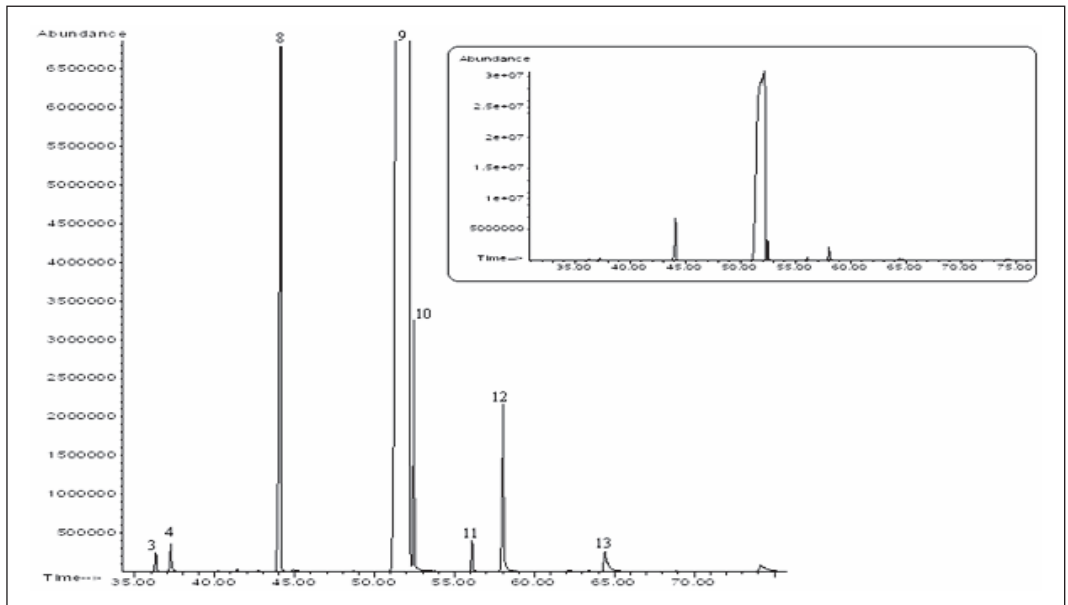


Figure 1 : Chromatogramme (GC-MS) de l'huile essentielle de *Ruta montana*.

Le chromatogramme a été agrandi pour faire apparaître tous les principaux pics du tableau 2. Le chromatogramme total est représenté en médaillon.

Les chiffres sur les pics correspondent à ceux des numéros d'ordre des composés du tableau 2

Selon Kambouche *et al.*, (2008), la 2-Undecanone reste le composé prédominant dans l'huile essentielle de *Ruta montana* provenant de la région d'Oran avec une teneur de 32.8% et également dans l'huile essentielle de l'espèce *Ruta chalepensis* (43.7%) alors qu'il ne représente que 1.3% chez l'espèce *Ruta graveolens* et n'est retrouvé que sous forme de traces chez *Ruta corsica*. On peut aussi noter la présence du 2-decanone comme deuxième composé majoritaire de notre huile avec une teneur de 3.3%. Ce constituant représente 1.96% chez *Ruta chalepensis* et est quasiment absent chez les autres espèces. La teneur en 2-Dodecanone (1%) de notre échantillon est relativement équivalente à celle de *Ruta chalepensis* (0.93%) mais reste élevée par rapport à celle de *Ruta graveolens* (0.2%).

Quant aux teneurs en polyphénols totaux (38.25 mg EAG/g d'extrait sec) et flavo-

noïdes (10.0 mg Equivalent Quercétine/g d'extrait sec), ces dernières sont, à titre comparatif, médianes par rapport à ceux rapportées dans la littérature pour d'autres espèces (tableau 4).

Concernant, l'activité antimicrobienne, les résultats obtenus (figure 2) montrent que l'huile essentielle présente une activité plus ou moins modérée, sauf dans le cas de *Klebsiella pneumoniae*, où la croissance de cette dernière est fortement inhibée soit un diamètre des zones d'inhibition de 59.7 mm (tableau 5). Par contre, *Pseudomonas aeruginosa* n'a pratiquement aucune sensibilité vis-à-vis de cette huile soit un diamètre des zones d'inhibition de 10 mm sachant que les disques ont un diamètre de 9 mm. La levure *Candida albicans*, qui est pathogène pour l'homme, affiche un diamètre de zone d'inhibition de 14 mm pour l'origan.

Tableau 4 : Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes de l'extrait de *Ruta montana* L. et d'autres *Ruta* sp.

Echantillons	Phénols totaux	Flavonoïdes
	(mg EAG /g d'extrait sec)	(mg EQ/g d'extrait sec)
<i>R. montana</i> - (Algérie) ⁽¹⁾	38.25	10.0
<i>R. Graveolans</i> - (Inde) ⁽²⁾	37	0.4-0.8
<i>R. Chalepensis</i> - (Tunisie) ⁽³⁾	67-151	71-87

⁽¹⁾ Ce travail.

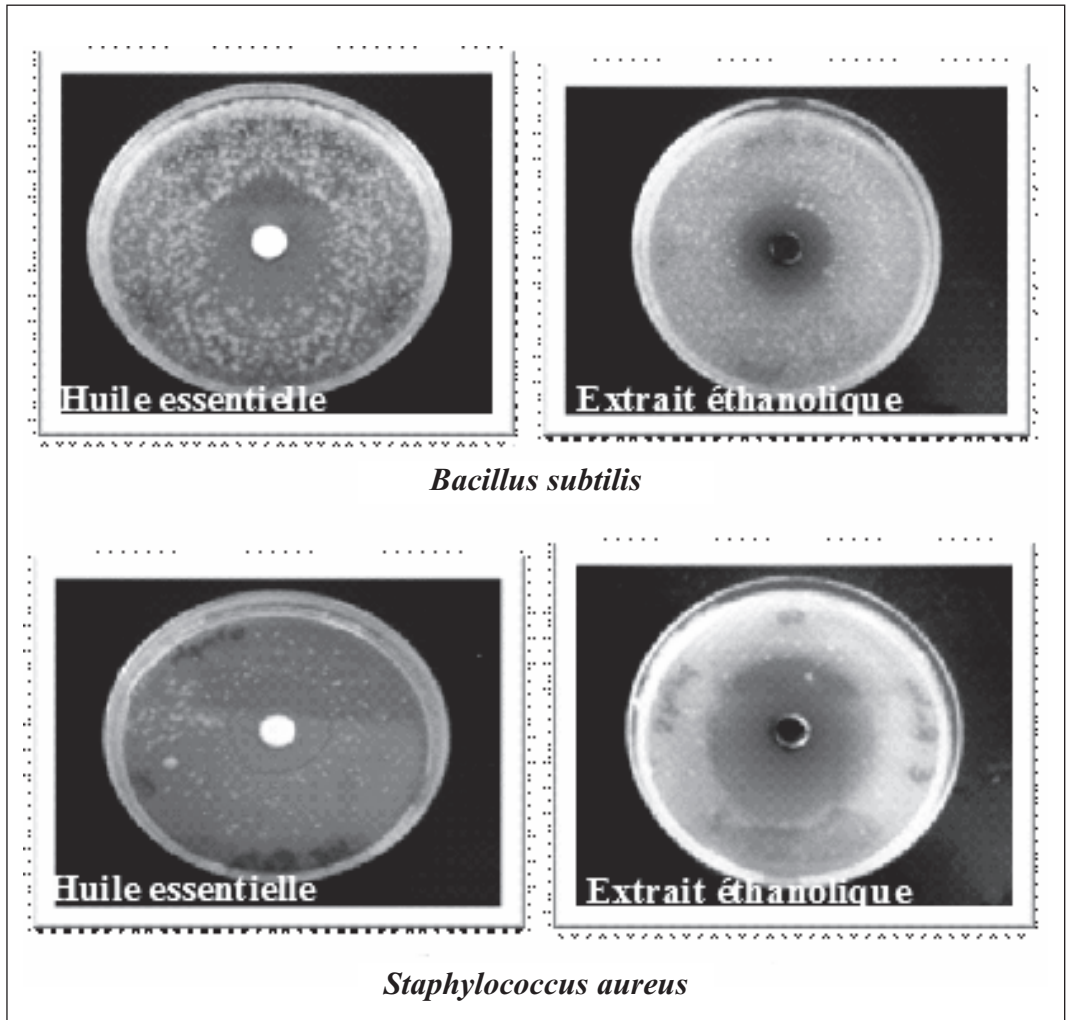
⁽²⁾ Diwan *et al.*, 2012.

⁽³⁾ Fakhfakh *et al.*, 2012.

Tableau 5 : Sensibilité des souches étudiées à l'huile essentielle et à l'extrait non volatil de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.).

Souches	Extrait	Huile essentielle
<i>Bacillus subtilis</i>	36.7 ± 1.15*	20.3 ± 1.52
<i>Staphylococcus aureus</i>	28.3 ± 1.52	17.7 ± 2.51
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.0 ± 2,00	10.3 ± 0.57
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13.0 ± 0.50	59.7 ± 0.57
<i>Candida albicans</i>	12.7 ± 0.57	14.0 ± 1.00

*Les valeurs des diffusions en mm sont les moyennes de trois répétitions ± écart-type.



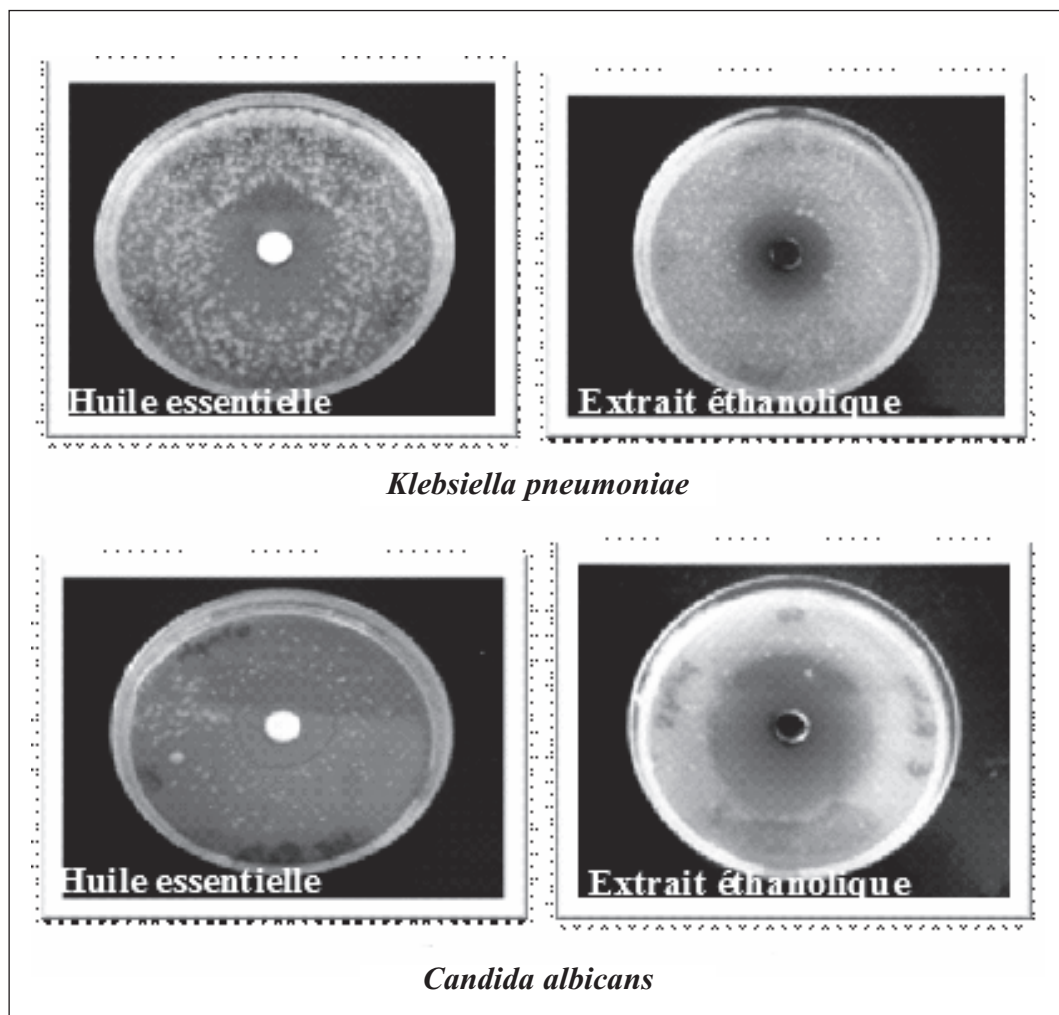


Figure 2 : Zones d'inhibition de l'huile essentielle et des extraits éthanoliques de *R. montana*.

Selon Nogueira *et al.*, (2008), les souches de *Candida* et de *staphylococcus* sont inhibées par l'huile essentielle de *Ruta graveolens*. Quant aux résultats obtenus dans cette étude, les huiles essentielles de *Ruta montana* n'ont montré qu'une faible activité antimicrobienne vis-à-vis de *Candida albicans* et une activité modérée pour *Staphylococcus aureus*.

Par ailleurs, on constate que l'extrait non volatil présente une bonne activité sur *Bacillus subtilis* (36,7mm) et *Staphylococcus aureus* (28,37mm). Toutefois, son activité est très faible vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans* (13 et 12,7 mm, respectivement).

Enfin, les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'extrait de *Ruta montana* a une faible activité antimicrobienne sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* alors qu'une forte inhibition concernant *Staphylococcus aureus* a été détectée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Nogueira *et al.*, (2008) qui ont montré que les extraits de *Ruta graveolens* sont inactifs sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Par contre, Bayoud *et al.*, (2007) ont montré, que l'extrait éthanolique et les alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta graveolens* et *Datura stramonium* ont une bonne activité antimicrobienne contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Escherichia coli*.

CONCLUSION

Ce travail se présente comme une première contribution à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de *Ruta montana* poussant en Algérie. Les résultats obtenus montrent une bonne activité antimicrobienne de cette plante contre trois souches microbiennes (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumonia*). Ces résultats incitent à tester d'autres activités biologiques de cette plante telles que l'activité insecticide et l'activité antifongique sur des souches phytopathogènes.

Références bibliographiques

- Alloun K. et Kaci M., 2010. Huiles essentielles et extraits d'*Origanum floribundum* et de *Ruta montana* : Composition chimique et activité antioxydante et antimicrobienne. Mémoire d'ingénieur, INA.
- Bayoud B., Djilani S.E., Legseir B., Ouahrani M.R., Djilani A., 2007. Antibacterial Activity of Ethanol Extracts and Total Alkaloids of *Datura Stramonium* and *Ruta Graveolens*. J. Life Sci., 1 (1), 78-81.
- Chao S. C., Young D. G., Oberg C.J., 2000. Screening for inhibitory activity of Essential Oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. J. Essent. Oil Res., 12, 639-649.
- Diwan R., Shinde A., Malpathak N., 2012. Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of *Ruta graveolens* L. In Vitro Culture Lines. Journal of Botany. Article ID 685427, 6 pages.
- Dob T., Dahmane D., Gauriat-Desrudy B., Daligault V., 2008. Volatile Constituents of the Essential Oil of *Ruta chalepensis* L. subsp. *angustifolia* (Pers.) P. Cout. J. Essent. Oil Res., 20, (4), 306-309.
- Fakhfakh N., Zouari S., Zouari M., Loussayef C., Zouari N., 2012. Chemical composition of volatile compounds and antioxidant Activities of essential oil,

- aqueous and ethanol Extracts of wild Tunisian *Ruta chalepensis* L. (Rutacea). J. Med. Plants Res. Vol.6 (4), 593-600.
- Hazzit, M., Baaliouamer, A., Verissimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. Food Chem. 116 (3) : 714-721.
- Kambouche N., Merah B., Bellahouel S., Bouayed J., Dicko A., Derdour A., Younos C., Soulimani R., 2008. Chemical Composition and Antioxidant Potential of *Ruta montana* L. Essential Oil from Algeria. J. Med. Food, 11 (3), 593-595.
- Lamaison J.L.C. et Carnet A., 1990. Teneur en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret DC) en fonction de la végétation. Pharm. Acta. Helv., 65, 315-320.
- Nogueira J. C. R., MeloDiniz M. F., Lima E. O., 2008. In vitro antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. Bras. Otorinolaringol, 74 (1), 118-124.
- Ozkan G., Sagdic O., and Ozkan M., 2003. Note: Inhibition of Pathogenic Bacteria by Essential Oils at Different Concentrations. Food Sci. Tech. Int., 9(2), 85-88.
- Quézel P. et Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition du CNRS, Paris, France. Vol. 2, 1170 pages.
- Richard H., 1992. Epices et aromates. Edition TEC publications, Paris, Lavoisier 339 p.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. In : Packer L. Ed. Oxidants and antioxidants, PT A, book series : Methods in Enzymology, Volume 299, Orlando. Academic Press. p. 152-178.
- Soleimani M., Azar P.A., Tehrani M.S., Rustaiyan A., 2009. Volatile Composition of *Ruta graveolens* L. of North of Iran. World Appl. Sci. J., 7 (1), 124-126.