

Manuscrit reçu le 12 janvier 2011 et accepté le 7 mars 2011

ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE CONTRE LA POURRITURE DU BOIS DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *PELARGONIUM X ASPERUM* ERTHRT. EX WILLD DES ÎLES COMORES

S.OMAR S. HASSANE^{1,3,4}, M. GHANMI², B. SATRANI²,
A. FARAH⁵, N. MANSOURI^{2,6} et A. CHAOUCH¹

¹ Laboratoire de biotechnologie, environnement et qualité, UFR du Génie des procédés, Faculté des Sciences Université Ibn Tofail, B.P. 133, Kenitra, 14000, Maroc

² Centre de recherche forestière B.P. 763, Agdal, Rabat, 10050, Maroc

³ Faculté des sciences et techniques, Université des Comores, B.P 2585, Moroni, Comores

⁴ Centre National de Documentation et de Recherche Scientifique, B.P 137, Moroni, Comores

⁵ Institut national des Plantes médicinales et aromatiques. BP 7048. MA-30007, Fès-Ezohour, Maroc.

⁶ Laboratoire d'ingénierie des matériaux organométalliques et moléculaires, Faculté des sciences Dhar El Mahraz, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, B.P 2202, 30000 Fès, Maroc.

Résumé

Dans le but de valoriser les plantes aromatiques et médicinales des îles Comores, cette étude porte sur la caractérisation chimique et l'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* des îles Comores contre quatre champignons responsables de la pourriture du bois. L'analyse par CG et CG/SM de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* obtenue par hydrodistillation de la partie aérienne (feuilles et fleurs) a donné comme principaux composés, le citronellol (29,98 %) et le géraniol (14,12 %). L'essence de *Pelargonium asperum* testée *in vitro* sur *Gloeophyllum trabeum* (Persoon ex Fries) Murril, *Coriolus Versicolor* (Linnaeus.) Quélet, *Poria placenta* (Fries) Cooke *sensu* J. Eriksson et *Coniophora puteana* (Schumacher ex Fries) a montré une très forte activité antifongique contre ces quatre champignons lignivores.

Mots-clés: *Pelargonium asperum*, huile essentielle, composition chimique, activité antifongique, champignons de pourriture du bois.

Abstract

In view of valorizing aromatic and medicinal plants from Comoros islands, this work focuses on the chemical characterization and the study of the antifungal activity of essential oil of *Pelargonium asperum* against four fungi responsible for wood decay. Analysis by GC and GC/MS of the essential oil of *Pelargonium asperum* obtained by hydrodistillation of the aerial part (leaves and flowers) showed as major compounds, citronnellol (29.98 %) and geraniol (14.12 %). The oil of *Pelargonium asperum* tested *in vitro* against *Gloeophyllum trabeum* (Persoon ex Fries) Murril, *Coriolus Versicolor* (Linnaeus.) Quelet, *Poria placenta* (Fries) Cooke J. sensu J. Eriksson and *Coniophora puteana* (Schumarcher ex Fries) showed a very strong antifungal activity against those four wood-rotting fungi.

Keywords: *Pelargonium asperum*, essential oil, chemical composition, antifungal activity, decay fungi wood.

1. INTRODUCTION

L'utilisation d'agents chimiques contre les espèces fongiques responsables de la pourriture du bois tels que le benzimidazole, le chromate acide de cuivre (CCA), l'arséniate de cuivre chromé (ACC) et l'arséniate de cuivre et de zinc (ACZA) pose de graves problèmes à l'environnement en raison de leur grande toxicité [1]. Selon Deferera *et al.* [1], un sérieux problème se pose quant à l'efficacité à long terme de ces produits qui se manifeste par un développement de la résistance des champignons pathogènes. Pour cela, la recherche de nouveaux produits contre les agents de la détérioration du bois ayant pour principes actifs des biomolécules naturellement présentes dans les plantes aromatiques et médicinales peut s'inscrire comme une solution écologique à un moindre coût [2]. Ainsi, l'utilisation des biocides naturels extraits des plantes notamment les huiles essentielles est de plus en plus évoquée [3].

Les huiles essentielles de nombreuses plantes sont devenues populaires ces dernières années et leurs principes bioactifs ont conquis récemment plusieurs secteurs

industriels [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]. Cependant, très peu d'études ont été réalisées sur leurs utilisations comme agents biologiques pour la protection du bois.

A notre connaissance, l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* n'a fait l'objet d'aucune investigation contre les microorganismes responsables des pourritures du bois. Par ailleurs, l'essence de *Pelargonium* est utilisée en médecine, en cosmétique, en phytosanitaire et en alimentation pour leurs effets antibactérien, antifongique, insecticide, antiseptique, cicatrisant, anti-inflammatoire, hémostatique, antioxydant et comme agents naturels pour la conservation des aliments [13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. Aux Comores, *Pelargonium asperum* (géranium bourbon) est utilisé en médecine traditionnelle et en alimentation [24, 25, 26].

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation chimique et à l'activité antifongique de l'huile de *Pelargonium asperum* contre les pourritures du bois dans le cadre général en vue d'une valorisation des plantes aromatiques et médicinales des Comores.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

L'échantillon des feuilles et fleurs de *Pelargonium asperum* a été récoltés au mois de mai (2008) en plein floraison à Ndrodroni - Mvouni, village en altitude (1020 m) sur le flanc du volcan Karthala, à l'Ouest de l'île de la Grande Comore. Les échantillons ont subi auparavant un séchage à l'ombre de quinze jours pour faciliter leur stockage.

2.2. Matériel fongique

Les champignons testés dans ce travail sont *Gloeophyllum trabeum* (Persoon ex Fries) Murril, *Coriolus Versicolor* (Linnaeus.) Quélet, *Poria placenta* (Fries) Cooke *sensu* J. Eriksson et *Coniophora puteana* (Schumacher ex Fries) Karsten, toutes espèces fongiques responsables des pourritures brunes et blanches du bois. Ils ont été choisis pour les dégâts considérables qu'ils causent aux bois d'œuvre et aux produits dérivés [27, 28]. Ces quatre champignons utilisés dans ces tests, appartiennent à la collection de la mycothèque du laboratoire de microbiologie et mycologie du

Centre de Recherche Forestière Rabat. Ils sont cultivés sur le milieu nutritif PDA (Potato Dextrose Agar) pendant sept jours, à 25°C et à l'obscurité.

2.3. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée sur la partie aérienne (feuilles et fleurs) par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger [29]. Pour chaque échantillon, trois distillations ont été réalisées pendant 1 h 30 à partir de 150 g de matériel végétal séché avec 1 litre d'eau dans un ballon de 2 litres surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant.

2.4. Procédure microbiologique

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles ont été déterminées selon la méthode rapportée par Remmal *et al.* [30] et Satrani *et al.* [31]. Du fait de la non miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 %. Elle permet d'obtenir, dans le milieu une répartition homogène des huiles essentielles et d'augmenter au maximum le contact germe/composé. Des dilutions sont préparées au 1/10^e, 1/25^e, 1/50^e, 1/100^e, 1/200^e, 1/300^e et 1/500^e, 1/600^e, 1/700^e, 1/800^e, 1/900^e et 1/1000^e dans cette solution d'agar. Dans des tubes à essai contenant chacun 13,5 ml du milieu solide TSA (Tryptic Soja Agar) pour les bactéries et le PDA (Potato Dextrose Agar) pour les moisissures, stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 121 °C et refroidis à 45°C, on ajoute aseptiquement 1,5 ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les dilutions finales de 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000 et 1/5000, 1/6000 1/7000, 1/8000, 1/9000 et 1/10000 v/v. On agite convenablement les tubes afin de bien disperser l'huile essentielle dans le milieu de culture avant de les verser dans les boîtes de Pétri. Des témoins, contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2 % seule, sont également préparés.

L'ensemencement se fait par stries à l'aide d'une anse de platine calibrée afin de prélever le même volume d'inoculum. Ce dernier se présente sous forme d'un bouillon de culture de 24 heures pour les bactéries et sous forme d'une suspension dans l'eau physiologique de spores provenant d'une culture de sept jours dans le PDA pour les moisissures. Pour les champignons, l'ensemencement se fait par dépôt de fragments de

1 cm de diamètre, prélevés à partir de la périphérie d'un tapis mycélien et provenant d'une culture de 7 jours dans l'extrait de malt. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25 °C pendant 7 jours pour les champignons. Chaque essai est répété trois fois.

2.5. Analyse chromatographique

Les analyses chromatographiques ont été effectuées grâce à un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Hewlett Packard (série HP 6890), équipé d'une colonne capillaire HP-5 (30m x 0,25mm) avec une épaisseur du film de 0,25 µm, d'un détecteur FID réglé à 250 °C et alimenté par un mélange de gaz H₂/Air et un injecteur split – splitless réglé à 250 °C. Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/50, débit : 66 ml/min). Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1,7 ml/min. La température de la colonne est programmée de 50 à 200 °C à raison d'une montée de 4°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.

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs indices de Kováts (IK) et sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Cette dernière est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard (série HP 6890) couplé avec un spectromètre de masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30mx0, 25mm), l'épaisseur du film est de 0,25 µm. La température de la colonne est programmée de 50 à 200°C à raison de 4°C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5ml/min. Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/70 débit 112 ml/min. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98.

Pour les analyses chromatographiques, les huiles essentielles ont été diluées dans le méthanol (1/20 v/v). L'identification des constituants est basée sur la comparaison de leurs spectres de masse (CPG/SM) respectifs avec les spectres de la bibliothèque (NIST 98) et sur la base de calcul des indices de Kováts.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'huile essentielle extraite par hydrodistillation est analysée par la chromatographie en phase gazeuse et par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse selon la méthode décrite par Adams [32] et Arpino [33].

Soixante et un constituants représentant un total d'environ 99,96 % de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* ont été identifiés (Tableau I).

L'essence de *Pelargonium asperum* des Comores est composée principalement de : citronellol (29,98 %), géraniol (14,12 %), formiate de citronellyle (9,09 %), isomenthone (7,80 %), linalol (5,97 %), (Z)- β -farenzène (4,27 %), formiate de géranyle (4,07 %), davanone (1,95 %), tiglate de citronellyle (1,52 %), acétate de citronellyle (1,24 %), β -thujaplicine et 1-nor-épi-bouronanone (1,09 %). Les concentrations des autres constituants sont inférieures à 1%.

Les résultats indiquent que l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* originaire des Comores est très complexe et variée. Ces résultats sont proches de ceux trouvés pour les huiles essentielles en provenance d'Afrique du Sud et de Madagascar étudiées respectivement par Cabrera [34] et Mazur [35] dont les principaux composés sont le citronellol, le géraniol, le formiate de citronellyle, l'isomenthone et le linalol. Cependant, quantitativement une différence existe pour les constituants majeurs de notre échantillon par rapport à ceux obtenus par ces auteurs. En effet, l'huile essentielle de géranium en provenance des Comores est plus riche en citronellol (29,98%) que celle d'Afrique du Sud et de Madagascar, dont les concentrations sont respectivement 20,24 % et 28,51 %. La teneur en géraniol de l'essence *Pelargonium asperum* comorienne est de 14,12 % contre 13,18 % pour celle d'origine malgache et 8,87 % pour celle d'origine sud-africaine. La teneur en formiate de citronellyle (9,09 %) pour l'échantillon d'essence étudiée est moins riche qu'à Madagascar (12,54%) ou en Afrique du Sud (17,61 %) pour l'huile de la même espèce. Le taux d'isomenthone est de 7,80 % pour l'essence de géranium des Comores, de 8,15 % pour celle de Madagascar et de 4,20 % pour celle d'Afrique du Sud. Pour les concentrations en linalol, elle est de 5,97 % pour l'huile de *Pelargonium* comorienne, de 3,84 % et de 2,50 % pour celles en provenance respectivement de Madagascar et d'Afrique du Sud. L'essence étudiée contient du (Z)- β -farenzène (4,08 %) contrairement à ces deux autres huiles originaires de l'Afrique du Sud et de Madagascar qui sont dépourvues de

Tableau I.- Composition chimique de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* des Comores.

N°	Composés	IK	Pourcentage (%)	N°	Composés	IK	Pourcentage (%)
1	α -thujène	931	0,50	32	formiate de géranyle	1300	4,07
2	sabinène	976	0,10	33	acétate d'isomenthyle	1304	0,07
3	β -myrcène	991	0,42	34	acétate d' α -terpinyle	1349	0,54
4	α -phéllandrène	1005	0,13	35	acétate de citronellyle	1353	1,24
5	α -terpinène	1017	0,14	36	acétate de neryle	1365	0,24
6	p-cymène	1025	0,12	37	α -copaène	1383	0,40
7	limonène	1031	0,21	38	β -bourbonène	1384	0,57
8	santolinol	1037	0,11	39	β -caryophyllène	1419	0,76
9	(Z)- β -ocymène	1040	0,14	40	γ -élémane	1436	0,43
10	(E)- β -ocymène	1050	0,22	41	(Z)- β -farenzène	1443	4,27
11	γ -terpinène	1060	0,10	42	épi- β -santalène	1448	0,29
12	cis-oxyde de linalol	1074	0,54	43	α -humulène	1454	0,22
13	fenchone	1087	0,26	44	β -thujaplicine	1474	1,09
14	linalol	1097	5,97	45	γ -thujaplicine	1484	0,71
15	cis-oxyde de rose	1111	0,82	46	β -selinène	1490	0,24
16	Myrcenol	1123	0,36	47	Germacrène	1510	0,15
17	trans-oxyde de rose	1127	0,36	48	γ -cadinène	1514	0,40
18	terpine-1-ol	1130	0,95	49	Δ -cadinène	1526	0,51
19	cis-Sabinol	1143	0,59	50	α -cadinène	1538	0,56
20	Citronellal	1152	0,33	51	1-nor-épi-bouronanone	1558	1,09
21	Isomenthone	164	7,80	52	isovalerate de neryle	1585	0,96
22	Santalone	1181	0,25	53	Davanone	1586	1,95
23	α -terpinéol	1189	0,70	54	Longibornéol	1597	0,40
24	Myrtenol	1196	0,41	55	10-épi- γ -eudesmol	1619	0,07
25	Citronellol	1228	29,98	56	1-épi-cubenol	1627	0,16
26	Carvone	1240	0,53	57	épi- α -Cadinol	1640	0,14
27	Géraniol	1255	14,12	58	α -eudesmol	1652	0,29
28	acétate de linalol	1257	0,15	59	7-épi- α -eudesmol	1658	0,20
29	Géraniale	1270	0,73	60	tiglate de citronellyle	1697	1,52
30	formiate de citronellyle	1275	9,09	61	tiglate de géranyle	1709	0,15
31	acétate d'isopulégyle	1278	0,14		Total		99,96

ce constituant qui peut donc être considéré comme caractéristique de l'huile de l'espèce originaire des Comores. Cette dernière se distingue aussi par sa richesse en rhodinol commercial (citronellol + géraniol + linlol) qui est de 50,07 % par rapport à celle de la même espèce d'Afrique du Sud (39,88 %) et de Madagascar (37,26 %). En outre, l'huile sur laquelle nous avons travaillé ne contient pas de guaiène mais plutôt une faible quantité de 10-épi- γ -eudemol sous forme de trace (0,07 %) [34, 35].

Le géranium n'est pas cultivé aux Comores, il pousse à l'état sauvage. En plus des

conditions de sol et de climat sur la Grande Comore qui sont différentes par rapport à celles rencontrées en Afrique du Sud et Madagascar peuvent avoir modifié sensiblement le profil chimique de cette huile. En effet, la provenance, les conditions climatiques et édaphiques, la période de récolte et la technique de séchage peuvent, avec le temps, modifier le profil chimique des huiles essentielles [36, 37]. Ainsi, la composition chimique dépend de tous ces facteurs qui peuvent orienter la biosynthèse en faveur de certaines molécules terpéniques au dépend d'autres constituants dont la synthèse peut être arrêtée [38, 39, 40, 41, 42].

L'activité antifongique contre les champignons responsables de la pourriture du bois a été évaluée en observant l'inhibition de la croissance des espèces fongiques testées en contact avec notre échantillon d'huile essentielle de *Pelargonium asperum* à différentes concentrations.

Les résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle sont regroupés dans le tableau II.

Tableau II- Activité antifongique de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* des Comores

Champignons	Concentration (v/v)												T
	1/100	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/5000	1/6000	1/7000	1/8000	1/9000	1/10000	
<i>C.puteana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C.versicolor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>P.placenta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>G.trabeum</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- : inhibition

+ : croissance

T : témoin

L'huile essentielle de *P. asperum* a exercé une très forte activité inhibitrice vis-à-vis de tous les champignons de pourriture du bois. Surtout, *Coriolus versicolor* et *Coniophora puteana* ont montré une grande sensibilité à cette huile, ils ont été inhibés à partir d'une très faible concentration de 1/8.000 v/v. Aussi, la concentration de 1/7.000 v/v a été suffisante pour arrêter la croissance de *Poria placenta*. Seul *Gloeophyllum trabeum* a résisté jusqu'à la concentration en huile de 1/500 v/v. L'huile essentielle de géranium bourbon s'est révélée donc très efficace contre les quatre

champignons lignivores testés. L'activité antifongique de cette essence contre les quatre microorganismes est attribuée principalement à ses composés majoritaires notamment les alcools terpéniques (citronellol, géraniol, linalol) qui représentent environ 50 % de sa composition totale. En effet, les terpénols sont connus pour leur plus grande efficacité et leur plus large spectre d'activité antimicrobienne [43, 44, 45, 46, 47, 48]. En outre, l'essence de *Pelargonium asperum* en provenance des Comores contient des thujaplicines (tropolones), en très faible quantité, mais certaines études ont montré l'efficacité ces substances naturelles contre des champignons de pourriture du bois d'œuvre [49, 50]. Donc ce grand pouvoir fongicide pourrait aussi être attribuée à la synergie entre divers constituants de cette huile [51, 52, 53, 54]. Nos investigations corroborent certains travaux qui ont relaté le pouvoir fongicide puissant de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* d'Afrique du Sud [15, 21, 52].

4. CONCLUSION

L'analyse qualitative et quantitative de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* a permis d'identifier 61 constituants. L'huile de *P. asperum* des Comores est riche en citronellol (29,80 %), en géraniol (14,12 %) et en formiate de citronellyle (9,09 %). Pour les quatre champignons testés, l'essence de *P. asperum* comorienne présente une très forte activité fongicide à des concentrations très faibles. Cette essence pourrait être un très bon produit naturel contre les champignons lignivores. Ces derniers ont un rôle très important dans la détérioration du bois car ils sont très redoutés par les industries du bois.

D'autres investigations doivent être entreprises sur l'utilisation de cette huile visant l'utilisation de cette huile. Ainsi, des tests *in vivo* sur des échantillons de bois pour cette essence de *P. asperum* d'origine comorienne devront être réalisés pour affirmer son efficacité contre ces champignons lignivores. De ces travaux de formulations chimiques à base d'huile essentielle de *P. asperum* pourraient être mises au point et être préconisées. Les recherches concernant les huiles essentielles pour le traitement du bois donnerait une autre dimension de valorisation des plantes aromatiques des Comores et serait à l'origine d'un renforcement et d'un développement de la recherche dans ce domaine qui prendrait en compte les facteurs environnementaux et la protection de la santé humaine.

Remerciements

Les auteurs remercient sincèrement le Pr Mohammed Lachkar, laboratoire d'ingénierie des matériaux organométalliques et moléculaires, Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès (Maroc), pour son appui technique dans ce travail.

RÉFÉRENCES

1. Deferera D.J., Ziogas B.N., and Polissiou M.G., (2000), *GCMS Analysis of essential oil from some Greek aromatic plants and their fungi toxicity on Penicillium digitatum*. J. Agric. Food Chem., **48**(6), 2576-2581.
2. Haluk J.P. and Roussel C., (1998), *Durabilité naturelle du Red cedar et application des biotechnologies végétales dans le domaine de la préservation du bois*. In : Communication 2e Journées Scientifiques Bois-Forêt, 1998, Épinal, France.
3. Durand P.Y., (1984), *A Technological Survey of plantation-grown Teak in Ivory Coast*. IUFRO Meeting - Project Group P5.01. Manaus, Brésil.
4. Ismaiel A. and Pierson M.D., (1990), *Inhibition of growth and germination of C. botulinum 33A, 40B, and 1623E by essential oil of spices*. J. Food Sci., **55**, 1676-1678.
5. Paster N., Juven B.J., Shaaya E., Menasherov M., Nitzan R., Weisslowicz H., and Ravid U., (1990), *Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria*. Lett. Appl. Microbiol., **11**, 33-37.
6. Mahmoud A.L.E., (1994), *Antifungal action and anti aflatoxigenic properties of some essential oil constituents*. Lett. Appl. Microbiol., **19**, 110-113.
7. Basilico M.Z. and Basilico J.C., (1999), *Inhibitory effects of some spice essential oils on Aspergillus ochraceus NRRL 3174 growth and ochratoxin a production*. Lett. Appl. Microbiol., **29**, 238-241.
8. Consentino S., Tuberosa C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., and Arzedi E. (1999), *In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils*. Lett. Appl. Microbiol., **29**(2), 130-135.
9. Cowan M.M., (1999), *Plant products as antimicrobial agents*. Clin. Microbiol. Rev., **12**, 564-582.
10. Karmen V., Bojana B., Vrtacnik M., and Pohleven F., (2003), *Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot Trametes versicolor and the brown-rot Coniophora puteana*. Int. Biodeterior. Biodegradation, **51**, 51-59.

11. Hammer K.A., Carson C.F., and Riley T.V., (2003), *Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil*. J. Appl. Microbiol. Immunol., **95** (4), 853-860.
12. Marino M., Bersani C., and Comi G., (1999), *Antimicrobial activity of the essential oils of Thymus vulgaris L. measured using a bioimpedometric method*. J. Food Prod., **62**, 1017-1023.
13. Guenther E., (1948), *The essential oils*. Volume 1. D Van Nostrand Company Inc, New-York, 452p.
14. Chaumont J.P. and Leger D., (1989), *Propriétés antifongiques de quelques phénols et composés chimiquement très voisins. Relations structure – activité*. Plant Med. Phyto., **23** (2), 124-126.
15. Lis-Balchin M., (1996), *Geranium oil*. International. J. Aromatherapy, **7**, 10-11.
16. Chang S.T., Chen P.F., and Chang S.C, (2001), *Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from Cinnamomum osmophloem*. J. Ethnopharmacol., **77**(1), 123-127.
17. Baydar H, Sagdic O., Ozkan G., and Karadogan T., (2004), *Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymus and Satureja species with commercial importance in Turkey*. Food Control., **15**, 169-172.
18. Burt S., (2004), *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods*. Int. J. Food Microbiol., **94**, 223-253.
19. Prabuseenivasan S., Jayakumar M., and Ignacimuthu S., (2006), *In vitro antibacterial activity of some plant essential oils*. BMC Complementary and Alternative Medicine, **6** (1), 39.
20. Kelen M. and Tepe B., (2008), *Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three Salvia species from Turkish flora*. Bioresource technology, **99** (10), 4096-4104.
21. Lalli J.Y., Van Zyl R.L., Vuren, and Viljoen A. M., (2008), *In vitro biological activities of South African Pelargonium (Geraniaceae) species*. South African J. Botany, **74**, 153-157.
22. Yi Z., Yu Y., Liang Y., and Zeng B., (2008), *In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of Pericarpium Citri reticulatae of a new Citrus cultivar and its main flavonoids*. LWT., **41**, 597-603.

23. Sayed A. Fayed, (2009), *Antioxidant and Anticancer Activities of Citrus reticulata (Petitgrain Mandarin) and Pelargonium graveolens (Geranium) Essential Oils*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, **5** (5), 740-747.
24. Adjanohoun E.J, Aké Assi L., Ali M., Eymé J., Guinko S., Kanyonga A., Keita A. et Lebras M. (1982), Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques aux Comores, Rapport présenté à l'ACCT. I.S.B.N. 92- 9028- 038- 7. 89p.
25. Plantes Aromatiques et Médicinales (PLARM), (1990-1997), Rapport sur le projet : Inventaire et Étude des plantes médicinales et aromatiques, des États de l'Océan Indien. Plantes médicinales des Comores, de Madagascar, les Mascareignes (Maurice et Rodrigues) et les Seychelles. Ethnobotaniques et phytochimiques. COI / UE. 94p.
26. Faujour A., (2004), Contribution à l'amélioration des soins de santé primaires par une investigation scientifique de la pharmacopée traditionnelle populaire des COMORES- Bilan de la phase pilote du projet- CNDRS (Centre National de Documentation et de la Recherche Scientifique), 248p.
27. Royer M., (2005-2007), *Molécules responsable de la stabilité des bois : cas des trois essences remarquables de Guyane*. Thèse Co-Direction UMR Ecofog / UPR 40. Université Antilles-Guyane.
28. Bobele N. F., (2007-2009), *Étude des mécanismes de durabilité naturelle mis en place chez le Teck*. Collaboration CIRAD / Université de Cocody (Abidjan – Côte d'Ivoire). Thèse en alternance franco-ivoirienne.
29. Clevenger J.F, (1928), *Apparatus for the determination of volatile oil*. J. Am. Pharm Assoc., **17**(4), 346-351.
30. Remmal A., Bouchikhi T., Rhayour K., and Ettayebi M., (1993), *Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium*. J. Ess Oil Res., **5**(2), 179-184.
31. Satrani B., Farah A., Fechtal M., Talbi. M., Blaghen M. et Chaouch A. (2001), *Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Satureja calamintha et Satureja alpina du Maroc*. Ann. Fals, Exp. Chim., **94** (956), 241-250.
32. Adams R.P., (1995), Identification of essential oil components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 469p.
33. Arpino P., Prévôt A., Sepinet J., Tranchant J., Vergnol A. et Wittier P. (1995), Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. (Éd) Masson, Paris.

34. Cabrera A., (2007), Bulletin d'analyse de l'huile de Géranium bourbon biologique *Pelargonium graveolens* L. d'Afrique du Sud—lot 8398 Laboratoire Florame aromathérapie, 1-3.
35. Mazur A. (2006), Fiche technique – Huile essentielle biologique Géranium Bourbon – *Pélargonium x asperum* Erthrt. Ex Willd (syn. *Pélargonium graveolens*) de Madagascar lot 7303 - laboratoire Florame aromathérapie, 1-3.
36. Kulkarni N., Baskani K., Raresh S., and Kumar S., (1996), *Intra-clonal variation for essential oil content and composition in plants derived from leaf cuttings of rose scented geranium (Pelargonium sp)*. Industrial crops and products, **6**, 107-112.
37. Loziene K. and Venskutonis P.R., (2004), *Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of Thymus pulegioides*. Biochemical systematics and ecology, **33**, 517-525.
38. Rajeswara Rao B.R., Kaul P.N, Mallavarapu G.R., and Ramesh S., (1996), *Effect of seasonal climatic changes on biomass yield and terpenoid composition of rosescented geranium*. Biochemical systematics and ecology, **24**, 627-635.
39. Boira H. and Blanquer A., (1997), *Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in Thymus piperella L*. Biochem. Systematics and Ecology, **26**, 811-822.
40. Barnola L.F. and Cedeno A., (1999), *Inter-population differences in the essential oils of Pinus caribaea needles*. Biochem. and systematics ecology, **28**, 923-931.
41. Rajeswara Rao B.R., Bhattacharya A. K., Kaul P.N., Chand S. and Ramesh S., (1993), *Changing in profiles of essential oil rose sented geranium (Pelargonium sp.) during leaf ontogeny*. Journal of Essential Oil Researc., **5**, 301-304.
42. Rajeswara Rao B.R., Sastry K.P., Prakasa Rao E.V.S., and Ramesh S.,(1994), *Variation in yield and quality of geranium (Pelargonium graveolens) under varied climatic and fertility conditions*. Journal of Essential Oil Research, **2**, 73-79.
43. Inouy S, Takizawa T., and Yawamagushi H., (2000), *Antibacterial activity of essential oils and their majors constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact*. J Antimicrob Chemother, **47**, 565-73.
44. Hammer K.A., Carson C.F., and Riley T.V., (2003), *Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil*, J. Appl. Microbiol., **95**, 853-860.
45. Gunther E., (1950), *The essential oils*. Volume 4. D. Van Nostrand Company Inc, New- York, 752 p.

46. Pellecuer J., Roussel J.L., and Andary C., (1973), *Propriétés antifongiques comparatives des essences de trois Labiées méditerranéennes : Romarin, Sarriette et Thym*. Travaux de la société de pharmacie de Montpellier, **33** (4), 584p.
47. Kamran S., Digrak M., Ravid U., and Iicim A., (2001), *Antibacterial and antifungal activity of essential oils of Thymus revolus Celak from Turkey*. J. Ethnopharmacology, **76**, 163-186.
48. Satrani B., Farah A., and Talbi M., (2006), *Effet de la distillation sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de Myrte (Myrtus communis L.) du Maroc*. Acta Bot. Gallica, **153** (2), 235-242.
49. Haluk J.P. et Roussel C., (2000), *Caractérisation et origine des tropolones responsables de la durabilité naturelle des Cupressacées. Application potentielle en préservation du bois*. Annals For Sciences, **57**, 819-829.
50. Sholberg P.L. and Shimizu B.N., (1991), *Use of natural plant products, hinokotiol to extend shelf-life of peaches*, Can. Inst. Sci. Technol. J., **24**, 273-277.
51. Franchomme P., (1981), *L'aromatologie à visée anti-infectieuse*. Phytomédecine, **1** (2), 25-47.
52. Kurita N. and Koik S., (1982), *Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components*. Agric. Biol. Chem., **46**, 159-165.
53. Burt S., (2004), *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods*. Int. J. Food Microbiol., **94**, 223-253.
54. Vinda-Martos M, Ruiz-Navaja Y., Fernanadez-Lopez J., and Perez-Alvarez A. J., (2008), *Antibacterial activity of different essential oils obtained from species widely used in Mediterranean diet*. International Journal of food Science and Technology, **43**, 526-531.