

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD
FACULTE DE MEDECINE
DR. B. BENZERDJEB - TLEMSEN



وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي

جامعة أبو بكر بلقايد
كلية الطب
د. ب. بن زرجب - تلمسان

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES POUR
L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

THÈME :

**Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne
des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la région de
Tlemcen.**

Présenté par : Guezzen Lotfi

Soutenu le : 11/07/2019

Le Jury

Président :

Pr.Abbad.S

Maitre de conférences en génie pharmaceutique.
Faculté de médecine de Tlemcen.

Membres :

Dr.Gana F.Z

Maitre assistante en pharmacie technologique.
Faculté de médecine de Tlemcen.

Dr.Boukenkoul.W

Maitre assistante en hémobiologie et transfusion sanguine .
Faculté de médecine de Tlemcen.

Encadreur :

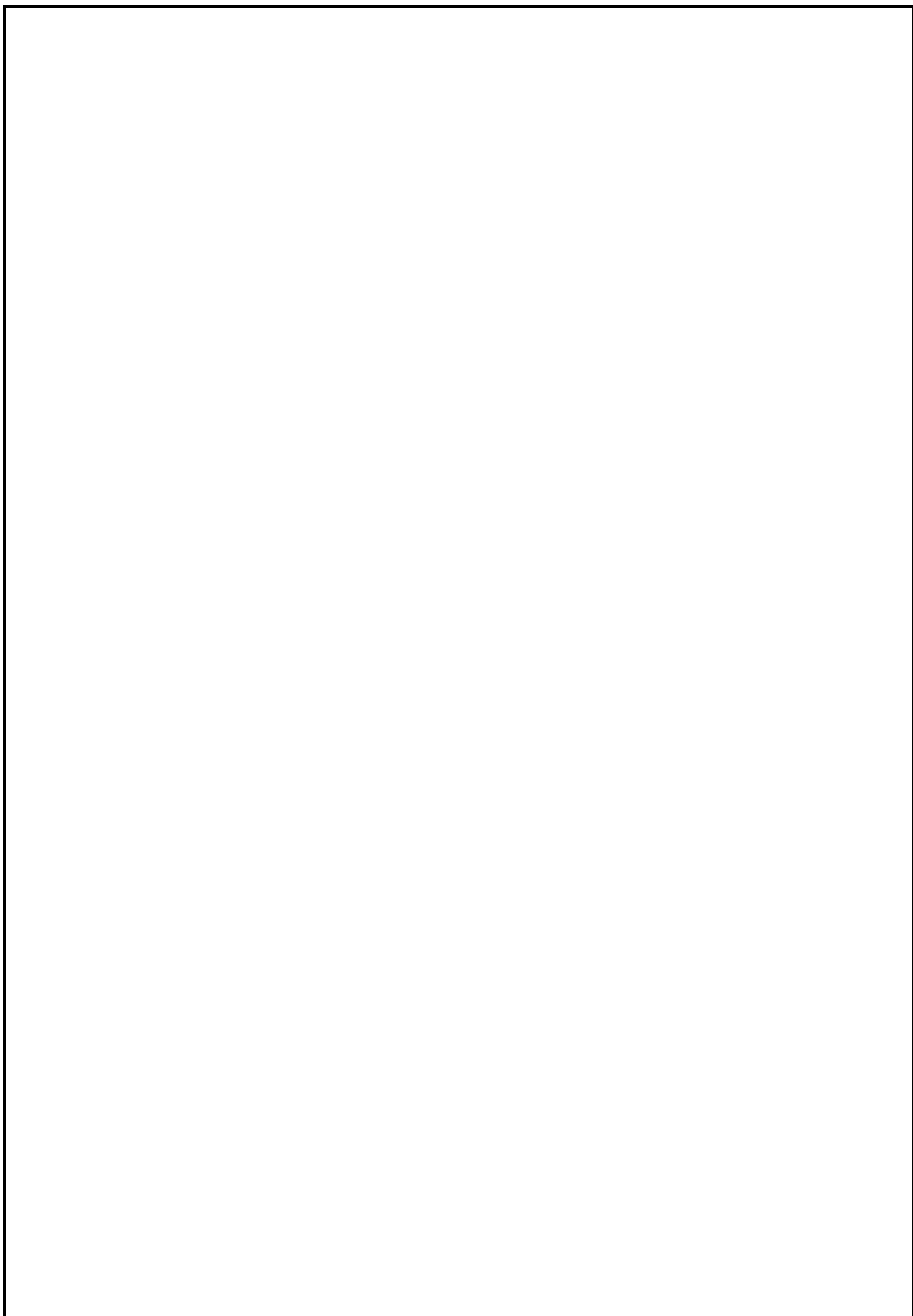
Dr.Kaddour.F

Maitre assistante en pharmacie technologique.
Faculté de médecine de Tlemcen.

Co-encadreur:

Dr.Aissaoui.N

Docteur en microbiologie.



*LOUANGE À
ALLAH*

*Le tout puissant, le miséricordieux
Le clément de nous avoir accordé la vie, la
santé, la force, et la patience d'aller
Jusqu'au bout du rêve.*

*A cœur veillant rien d'impossible
A conscience tranquille tout est accessible
Quand il y'a la soif d'apprendre
Tout vient à point à qui sait attendre
Quand il y'a le souci de réaliser un dessin
Tout devient facile pour arriver à nos fins
Malgré les obstacles qui s'opposent
En dépit des difficultés des qui s'interposent
Les études sont avant tout
Notre unique et seul atout
Ils représentent la lumière de notre existence
L'étoile brillante de notre jouissance
Comme un vol du gerfaut hors du charnier natal
Nous partons ivres d'un rêve héroïque et brutal
Espérant des lendemains épiques
Un avenir glorieux et magique
Souhaitons que le fruit de nos efforts fournis
Jours et nuit, nous mènera vers le bonheur fleuri
Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys
Nous prions dieu que cette soutenance
Fera signe de persévérance
Et que nous serions enchantés par notre travail honoré.*

Je dédie cet événement marquant de ma vie à...

A mes très chers parents

Voici le jour que vous avez attendu impatiemment. Aucun mot ne saurait exprimer ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance envers les deux personnes les plus chères à mon cœur.

Vos prières, vos sacrifices et votre soutien inconditionné m'ont comblé tout au long de mon existence. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Que Dieu tout puissant vous procure la santé, le bonheur et la prospérité.

A mes très chère frère, et sœur

Merci de m'avoir accompagné pendant toute ma vie, d'être toujours là pour moi. Je vous aime tous. Qu'Allah le tout puissant, vous protège et vous exauce tous vos vœux.

A mes oncles, tantes, cousins et cousines

Merci pour votre aide, vos encouragements, vos prières m'ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

À mes très chers amis

M.Djellad A.Youssef B.Ramzi Y.Sari hassoune B. N.Achour talet M.Abdelaoui A.Ghomari en témoignage de l'amitié qui nous unie et des souvenirs que nous avons passés ensemble, je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A la personne qui était toujours à mes cotés pour me soutenir B.Benmansour.

A mes collègues de la promotion de pharmacie 2013

Pour toute l'aventure qu'on a vécue ensemble durant les six dernières années, je vous félicite pour votre patience, soutien et fidélité.

G. lotfi

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Je tiens à exprimer mon profonds remerciements

*À mon encadreur **Dr F.Kaddour** pour tous les efforts fournis afin de mener à terme notre mémoire.*

À

*A mon co-encadreur **Dr N.Aissaoui** je vous suis très reconnaissantes de votre collaboration avec nous pour l'accomplissement de ce travail.*

*À mon présidente de jury **Pr.S.Abbad** je vous remercie humblement d'avoir accepté de le juger Veuillez trouver ici, le témoignage de notre admiration et de notre respect.*

Mes remerciements va également aux membres du jury :

***Dr W.Boukenkoul** et **Dr FZ.Gana** qui nous font l'honneur de juger ce travail, de l'examiner et de l'enrichir par leurs connaissances et leurs propositions.*

Je tiens à exprimer mon gratitude

*Au **Pr Nabil Borsali**, au **Dr Souad Guendouz** et au **Dr Souhila Guendouz** au **Dr Amira Iles** pour leurs conseils et aide indispensables. Vous trouverez ici l'expression de mon profond Respect et reconnaissance.*

*Au **Dr BORSALI Nabil** et au **Dr SEDJELMACI Nesrine** de nous avoir conseillées, guidées et motivées.*

Enfin nos sincères gratitudees à tous les enseignants du département de pharmacie qui nous ont suivi tout au long du cursus.

Table des matières

Liste des abréviations.....	7
Introduction	8
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
CHAPITRE I :.....	11
PHYTOTHERAPIE ET AROMATHERAPHIE.....	11
I. Phytothérapie	12
I.1. Définition de la phytothérapie	12
I.2.Métabolites secondaires des plantes dans la découverte des médicaments	13
II. Aromathérapie.....	14
II.1. Définition de l’aromathérapie	14
II.2. Historique de l’usage des plantes aromatiques	15
II.3. L’apparition de l’aromathérapie moderne	16
III. Huile essentielle.....	17
III.1. Historique	17
III.2. Définition et caractéristiques des huiles essentielles	19
III.3. Importance économique des huiles essentielles.....	20
III.4. Principaux domaines d’application	22
III.6. Fonction de l’huile essentielle dans la plante	25
III.7. Composition chimique.....	25
III.8. Facteurs influençant la composition chimique	32
III.8.1. Les facteurs extrinsèques	33
III.8.2. Facteurs intrinsèques.....	34
III.9. Les chémotypes des huiles essentielles	35
III.10. Les techniques d’extractions des huiles essentielles	35
III.10.1. Méthodes conventionnelles et classiques.....	36
a. Hydro-distillation	36
b. Hydro-distillation à la vapeur	37
c. Distillation à la vapeur	37
d. L’hydro-diffusion :.....	38
f. Pression à froid	38

g. L'enfleurage :	39
➤ L'enfleurage à froid	39
➤ L'enfleurage à chaud	39
III.10.2. Méthodes innovantes d'extraction des huiles essentielles	40
a. Extraction au CO ₂ supercritique	40
b. Extraction assistée par ultrasons	41
c. Extraction au CO ₂ sub-critique :	41
d. Hydro-distillation par micro- ondes sous vide	41
III.11. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles	42
a. Le couplage CPG-SM	43
• Principe	45
III.12. Propriétés biologiques et pharmaceutiques	46
➤ Activité antimicrobienne	46
Il a été constaté que la gravité des infections bactériennes a augmenté et cela	46
➤ Activité antifongique	48
Activité antivirale :	48
➤ Activité antiparasitaire	49
➤ Propriétés antioxydantes	49
➤ Activité anti-inflammatoire	49
➤ Activité antalgique et analgésique	50
➤ Activité spasmolytique	51
III.13. Toxicité des huiles essentielles	52
III.14. Critère de qualité	54
II.15. Les conditions de conservation et de stockage	54
Chapitre 2 : Monographies des	56
Plantes étudiées	56
I.1. Thym: <i>Thymus ciliatus</i>	57
I.1.1. Nomenclature et taxonomie	57
I.1.2. Description botanique	57
I.1.3. Répartition géographique	58
I.1.4. Composition de l'huile essentielle	58
I.1.5. Utilisation traditionnelle	59
I.1.6. Activité biologique	59
II.2.1. Nomenclature et taxonomie	59

II.2.3 Répartition géographique	60
II.2.4. Composition de l'huile essentielle	61
II.2.5. Usage	61
Partie pratique.....	62
MATERIEL ET METHODES.....	63
I. Introduction.....	64
II. Matériels et Méthodes.....	64
II.1. Matériel végétal	64
II.1.1. Origine géographique et période de récolte de la plante	64
II.1.3. Préparation du matériel végétal.....	65
II.1.4. Extraction d'huile essentielle	66
II.2.1.Evaluation de l'activité antioxydante	67
➤ Méthode de réduction du radical libre DPPH.....	67
II.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	69
• Activité antibactérienne	69
a. Souches utilisées	69
b. Technique de diffusion sur gélose	69
c. Méthode de microdilution sur milieu liquide.....	70
• Activité antifongique:.....	71
a.Souches utilisées	71
b. Technique de diffusion sur gélose	71
c. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	72
RESULTATS ET DISCUSSION	74
III.1. LE RENDEMENT DES HES.....	75
III.2. Propriétés organoleptiques des HES	76
III.3.Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles par la méthode de réduction du radical libre DPPH.....	77
III.4.1.Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles par la méthode de diffusion des disques.....	83
III.4.2.Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentiels par la méthode des plaques de microtitration.	87
Annexe	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	96

Liste des tableaux

Tableau I: La production des huiles essentielles dans le monde.....	22
Tableau II: Classification de l'espèce <i>Thymus ciliatus coloratus</i>	57
Tableau III: Classification de l'espèce <i>origanum vulgare</i>	59
Tableau IV: Paramètres géographiques du thym et de l'origan utilisés	65
Tableau V: Souches utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne.....	69
Tableau VI: Rendement des HEs	75
Tableau VII:: L'activité scavenger du radical DPPH par l'HE d'O.vulgare l'HE de <i>Thymus ciliatus</i> et le BHT.....	80
Tableau VIII: Résultats de l'activité antimicrobienne des deux H.E testée par la technique de diffusion des disques	85
Tableau IX: Résultats des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des deux H.E.....	88

Liste des figures

Figure 1: production mondiale des 13 plus importantes HE (en tonnes)(54).....	22
Figure 2 : Représentation d'une unité isoprène.....	26
Figure 3: Structure d'un monoterpène acyclique à gauche (myrcène) et d'un monoterpène cyclique à droite (ρ -cimène).....	27
Figure 4: Structure générale d'un sesquiterpène	27
Figure 5: Exemples d'un alcool acyclique à gauche (géraniol) et d'un alcool cyclique à droite (menthol).....	28
Figure 6: Structure du néral (à gauche) et du géranial (à droite).....	28
Figure 7: Structure de la menthone, une cétone terpénique.	29
Figure 8: Structure d'un oxyde terpénique aliphatique à gauche et cyclique à droite.	29
Figure 9: Structure d'un ester terpénique : l'acétate de linalyle.....	30
Figure 10: Structure d'un phénol terpénique, le carvacrol.	31
Figure 11: Structure générale des lactones terpéniques	31
Figure 12: Structure générale d'un aldéhyde aromatique.....	32
Figure 13: Schéma de l'hydro-distillation par clevenger.	37
Figure 14: schéma repretative de l'hydro-distillation et de la distillation a la vapeur.....	38
Figure 15: Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse(39).....	44
Figure 16: Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier (103).	46
Figure 17: <i>Tymus ciliatus coloratus</i>	57
Figure 18: <i>Origanum vulgare</i> (140).....	60
Figure 19: Séchage de l'origan à l'air libre	66
Figure 20: Dispositif d'extraction d'huile essentielle de type Clevenger utilisé pour l'extraction des huiles essentielles	67
Figure 21: Forme libre et réduite du DPPH (151).....	68
Figure 22: Ensemencement par écouvillon.	70
Figure 23: Principe de la méthode de diffusion sur disque.	72
Figure 24: HEs du thym et d'origan.....	77
Figure 25: % d'inhibition en fonction de la concentration de l'H.E du thym.....	78
Figure 26: % d'inhibition en fonction de la concentration de l'H.E de l'origan.....	78
Figure 27:: % d'inhibition en fonction de la concentration du BHT.....	79
Figure 28: IC50 des HEs étudiées et du BHT.	80

Figure 29:: activité antibactérienne des deux huiles essentielles par la technique des disques à droite : résultats de l'H.E. de l'origan ; à gauche : résultats de l'H.E. du thym..... 84

Figure 30: activité anti bactérienne des deux huiles essentielles par la technique des disques : à droite : résultats de l'H.E. du thym; à gauche : résultats de l'H.E. de l'origan..... 86

Liste des abréviations

AFNOR: Association Française de Normalisation

CC: Chromatographie sur colonne ouverte

CCM: Chromatographie sur couche mince

CPG: Chromatographie en phase gazeuse

H.E: Huile essentielle

HPLC: Chromatographie liquide haute performance

IE: Impact électronique

Ir: Indice de rétention

Kg: Kilogramme

LGEO: Lemongrass essentiel oil

RMN: Résonance magnétique nucléaire

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SM: Spectroscopie de masse

IC50: concentration d'inhibition 50

CMI: concentration minimal inhibitrice

BHT : hydroxytoluène butylé

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

Introduction

Introduction :

Depuis l'antiquité, l'homme s'est appuyé sur la nature pour subvenir à ses nécessités de base à savoir la nourriture, l'habillement, l'abri et également pour ses besoins médicamenteux. En effet, la plupart des moyens découverts pour soigner et soulager les maux sont d'origine végétale (1).

L'utilisation des plantes par l'être humain pour leurs propriétés médicinales remonte aux plus hautes antiquités. Elle trouve ses origines dans les plus grandes civilisations de l'Orient et de l'Occident, ainsi les sumériens, les égyptiens, les chinois et les indous possédaient toute une panoplie de remèdes à base de plantes(2)(3). On trouve la première trace de cet usage sur un morceau de papyrus égyptien, daté de 1 500 av. J.-C. ainsi qu'à Sumer.

Dans les ruines de Nippur, on a retrouvé une tablette d'argile écrite en caractères cunéiformes par un médecin sumérien qui vivait vers la fin du IIIe millénaire av. J.-C. Sur cette tablette, il a rassemblé ses prescriptions les plus précieuses. Ce document est considéré comme le plus vieux manuel de médecine au monde (4).

La phytothérapie continue à être utilisée partout dans le monde. Dans les pays en voie de développement, il est estimé qu'entre 70 et 95% de la population utilisent les plantes médicinales pour les soins primaires du fait de leur réelle efficacité (5). Le regain d'intérêt aux plantes médicinales et leurs extraits telles les huiles essentielles, vient essentiellement d'une prise de conscience des malades et de leur désir profond de revenir aux moyens naturels et efficaces. Elles offrent ainsi un espoir de guérison des maladies contemporaines et nécessitent un approfondissement sur les connaissances des nouveaux produits phytothérapeutiques. Le malade tend de plus en plus à fuir les substances chimiques pour éviter les effets délétères qu'elles peuvent induire (6).

Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits. Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes. En Afrique, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui contribuent pour 90% du traitement médical. Jusqu'en 2004, on a estimé que près de 75% de la population africaine ont toujours recours aux plantes pour se soigner. De plus ce type de soin est considéré souvent comme faisant partie de la médecine douce (7).

Introduction

La région méditerranéenne, en dépit de sa localisation dans une zone tempérée, possède des zones biogéographiques parmi les plus rares au monde et une biodiversité de première importance avec beaucoup de plantes d'intérêt thérapeutique. Près de 25.000 espèces sont présentes, ce qui correspond à 9.2% des espèces identifiées sur un territoire représentant seulement 1.5% de la surface terrestre et un pourcentage très élevé de ces dernières sont endémiques (8). En Algérie les gens faisaient toujours appel à la phytothérapie, ce qui a permis le maintien d'une tradition thérapeutique vivante en dépit du développement spectaculaire de la médecine moderne.

L'aromathérapie fait partie d'un patrimoine végétal qu'il faut préserver et protéger. Les huiles essentielles provenant des plantes aromatiques et médicinales possèdent un très large spectre d'action et sont utilisées dans plusieurs pathologies grâce à leurs effets pharmacologiques, notamment : antispasmodiques, carminatifs, hépato-protecteurs, antiviraux, anticancéreux, antioxydants et anti microbienne très importante dans diverses thérapies (9).

Pour parvenir à une amélioration de cette médecine traditionnelle, Les investigations phytochimiques doivent être faites, afin d'apporter une justification scientifique quant à l'utilisation traditionnelle des substances naturelles.

Ce travail de mémoire de fin d'étude est alors réalisé pour valoriser les extraits végétaux aromatiques (les huiles essentielles) de deux plantes aromatiques et médicinales de la famille de lamiacée de la région de Tlemcen : Thym (*Thymus ciliatus*) et l'Origan (*Origanum vulgare*) très utilisées par la population locale à des fins thérapeutiques et culinaires et d'étudier leurs activités antioxydante et antimicrobienne.

Ce mémoire est divisé en trois parties :

La première partie aborde une étude bibliographique en la matière subdivisée en deux chapitres : le premier chapitre donne des approches sur la phytothérapie, l'aromathérapie et les huiles essentielles. Le deuxième chapitre est réservé à la description des plantes étudiées.

La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisés.

La troisième partie est consacrées à la présentation et la discussion des résultats obtenus. Enfin, cette étude s'achève par une conclusion générale et des perspectives pour le futur.

**ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE I :
PHYTOTHERAPIE ET
AROMATHERAPHIE

I. Phytothérapie

I.1. Définition de la phytothérapie

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : "phuton" et "therapeia" qui signifient respectivement "plante" et "traitement"(10). La Phytothérapie avant tout se définit comme étant une discipline allopathique, fondée sur l'utilisation thérapeutique de la plante médicinale, qui est basée sur des connaissances issues de la tradition. Elle est destinée à prévenir ou à traiter certains troubles fonctionnels mineurs ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de certaines parties ou de préparations (10).

L'utilisation des plantes se fait par ingestion interne ou application externe sous la forme de tisanes, gélules, alcoolats et teintures, d'extraits ou huile fixe ou essentielle.

Les plantes comportent un certain nombre de constituants qui se potentialisent et s'harmonisent, constituant le totum de la plante, à l'inverse de l'allo-thérapie qui concentre une seule ou quelques molécules en quantité importante.

On distingue deux types de phytothérapies :

- Une pratique très ancienne, basée sur l'utilisation des plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS, elle est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement utilisée dans les pays en voie de développement. C'est le plus souvent une médecine non conventionnelle, du fait de l'absence d'études cliniques (11).
- La seconde forme existante est la phytothérapie clinique. elle prend naissance avec le Docteur Valnet, médecin et chirurgien des armées (1920-1995), qui a réhabilité dès 1948 les traitements naturels, en définissant plus particulièrement et scientifiquement le pouvoir thérapeutique des huiles essentielles (12). Puis le docteur Duraffourd a suivi ses traces et a permis de passer de la phytothérapie à l'endo biogénie. Elle est basée sur des principes scientifiques, d'expérimentation et humains d'individualisation permettant de diminuer la souffrance et les maux (13).

Nous pouvons certifier que la phytothérapie devrait figurer en bonne place dans notre arsenal thérapeutique quotidien, sans que cela soit considéré comme une pratique marginale ou dépassée.

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

Naturellement, le médecin phytothérapeute peut prescrire toute molécule de synthèse qu'il estime utile et nécessaire à la guérison de son patient (14), mais il le fera avec discernement et à bon escient, en évaluant au mieux le rapport bénéfice/ risque.

L'avantage majeur de la phytothérapie est l'exceptionnelle tolérance des plantes médicinales, si elles sont choisies soigneusement en respectant les indications, contre-indications et en tenant compte des éventuelles interactions. Il permet ainsi d'éviter les effets secondaires, les effets rebonds, de rétrocontrôles négatifs et de dépendance fréquemment rencontrés avec les médicaments de synthèse (15).

Enfin il est primordial de préciser que connaître une plante, c'est aussi être conscient de ses dangers et les limites de son utilisation car la phytothérapie n'est pas une technique anodine(15).

I.2.Métabolites secondaires des plantes dans la découverte des médicaments

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base : acides nucléiques, lipides, protéines, acides aminés et glucides. Les plantes produisent, en plus, un nombre très important de composés qui ne dérivent pas directement de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés métabolites secondaires (16).

Ces derniers constituent un ensemble de molécules qui ne sont pas strictement indispensables à la survie d'une plante, d'une bactérie ou d'un champignon.

Il s'agit majoritairement de molécules de taille et de masse faibles comparées aux molécules du métabolisme primaire (glucides, lipides et acides aminés). Elles sont la source d'odeurs jouant un rôle à la fois attractif et répulsif envers les prédateurs (concurrents écologiques); et de pigments permettant de capter et de protéger la plante du rayonnement solaire.

Ils sont également d'un intérêt en raison de leur utilisation comme colorants, fibres, colles, huiles, cires, agents aromatisants, des médicaments et des parfums, et ils sont considérés comme des sources potentielles de nouveaux médicaments naturels, des antibiotiques, insecticides et les herbicides (17).

Ces dernières années, leur rôle comme conservateur des produits alimentaires est devenu un domaine de plus en plus important de la recherche en nutrition humaine.

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

En outre, Ils peuvent avoir des effets favorables dans la prévention de cancers et de nombreuses maladies chroniques, tels que les maladies cardiovasculaires et le diabète de type II, qui touchent les populations à une fréquence croissante et inquiétante.

Basés sur leurs origines biosynthétiques, les métabolites secondaires des plantes peuvent être divisés en trois grands groupes (1):

- Flavonoïdes et composés phénoliques et polys phénoliques.
- Terpenoïdes.
- Alcaloïdes et composés soufrés.

II. Aromathérapie

L'histoire de l'aromathérapie se divise en quatre grandes périodes durant lesquelles le savoir autour des plantes à essence et de leur usage s'est affiné.

Au départ, les plantes aromatiques étaient utilisées telles quelles, introduite dans l'alimentation, macérées, infusées ou décoctées. La relation entre leurs vertus thérapeutiques et leur caractère aromatique n'était pas encore établi.

Lorsque l'intérêt thérapeutique des substances odorantes a été envisagé, leurs utilisations ont évolué, les plantes étaient alors brûlées, macérées ou infusées dans des huiles végétales. Plus tard l'invention de la distillation a permis d'extraire les substances aromatiques, le concept « huile essentielle » est né. Mais c'est la fin du XIXème siècle qui marque les débuts de l'aromathérapie moderne.

II.1. Définition de l'aromathérapie

Le mot « aromathérapie » vient du latin aroma, « aromate » et du grec therapeia,«traitement».

L'aromathérapie se fonde sur des connaissances botaniques précises. Elle correspond, à l'utilisation de la seule fraction aromatique des plantes afin de parfumer, prévenir ou soulager des symptômes d'ordre physique ou nerveux. Elle se différencie de la phytothérapie qui elle, utilise l'ensemble de la plante. C'est une "bio-chimio-thérapie" naturelle qui se base sur la relation existant entre les composants chimiques des huiles essentielles et les activités thérapeutiques qui en découlent (47).

L'aromathérapie scientifique ou aromatologie est l'étude des huiles essentielles. Il s'agit d'une science qui recourt à une méthodologie rigoureuse et repose sur des données scientifiques solides, prouvées par la clinique et par de nombreux tests en laboratoire.

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

C'est une thérapeutique naturelle de qualité, très efficace et qui complète très bien toutes les autres approches alternatives ou allopathiques (47).

II.2. Historique de l'usage des plantes aromatiques

Soigner avec les plantes aromatiques est l'une des techniques empiriques ou l'homme utilisait des plantes entières en infusion , cataplasme, macération et décoction (18).

Plus tard en Inde , Chine , et Égypte , on arriva suite à des recherches à tirer les principes aromatiques des plantes (19).

Au moyen orient les sumériens utilisaient (fenouil , ail, et le pin) comme traitements , et d'ailleurs plus tard en 1973 , on retrouva une plaque en argile près d 'Alep , qui a été considérée comme le 1 er manuel de médecine au monde , montrant que les médecins utilisaient des substances animales (lait , peau de serpent , écailles de tortures) , minérales et végétales (myrte et thym)(20).

Par ailleurs, l'embaumement des pharaons était a base de mélange d'huiles aromatiques de cèdre et basilic (21)(22), aussi le médecin Imohtep (2778 av JC) du pharaon Djoser , utilisait l'ail , cannelle , cardamome et cumin pour ses traitements (23).

En Inde on retrouve la médecine ayurvédique faisant intervenir maintes plantes aromatiques dans les bains et les massages.

Ainsi que le chanvre indien qui était déjà utilisé par susruta pour son effet anesthésiant 2000 ans av JC (23) , en Chine ont été publiés des traités de médecine répertoriant les plantes médicinales aromatiques telle que l'anis , cannelle gingembre et curcuma , par le médecin érudit et empereur Chen-Nong (2800 av JC)(23).

En Grèce on se servait des HE pour la parfumerie , par la suite Hippocrate rassembla toutes les connaissances médicales dans le livre des aphorismes listant près de 230 plantes et expliquant leur observations médicales , puis Aristote avec 500 plantes et enfin Théophraste avec son livre (Historia Plantarum) (20).

À Athènes, Hippocrate lutta contre les épidémies, et tout particulièrement contre la grande peste qui ravagea la ville, en faisant brûler de la lavande, du romarin, de l'hysope et de la sarriette (20). Plus tard, une utilisation plus systématique des arômes se développa en Grèce, tout particulièrement sous forme de massage (34).

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

Les romains a leur tour s'intéressèrent aux HE et épices , à cette époque les bains aromatiques, lotions et crèmes parfumées étaient d'usage courant à Rome comme nous l'indique l'Histoire naturelle universelle de Pline l'Ancien (24). **Dioscoride**, médecin du I^{er} siècle apr. J.-C., dresse dans son « De Materia medica » l'inventaire de 519 espèces de plantes (25).

Cependant, les arabes sont les vrais fondateurs de l'aromathérapie qui, avec l'invention de l'alambic et le serpentín ont évolué la technique de la distillation et ont monopolisé le marché des huiles essentielles pour plusieurs décennies(26). **Avicenne** (980-1037), produit la première huile essentielle pure, l'huile essentielle de *Rosa centifolia*, et en décrit de nombreuses autres dans le « Canon de la médecine ». **Ibn khaldoun**, pour sa part, donne plusieurs détails techniques sur l'art de la distillation à feu nu et sur la fabrication de sucS végétaux et des huiles par pression (26).

À la fin du XVI^{ème} siècle, les propriétés thérapeutiques de plus d'une centaine d'huiles essentielles sont connues. De nombreuses préparations sont préparées et utilisées à des fins préventif et thérapeutique.

Malgré leur intérêt, les huiles essentielles ont vu leur usage tomber en désuétude jusqu'à la fin du XIX^{ème} siècle (27).

II.3. L'apparition de l'aromathérapie moderne

L'aromathérapie moderne est apparue à partir des année 1880 avec la progression et l'évolution des méthodes chimiques qui ont contribué à l'isolement des composants des huiles essentiels, utilisés à des fins thérapeutiques (28).

Plusieurs travaux ont été faits, vient en premier celui de Koch en 1881 sur l'huile essentielle de térébenthine, puis celui de Michel en 1883 sur le pouvoir bactéricide du thymol, Chamberland 1887 et Cadéac et Meunier 1888 sur les propriétés antiseptiques des huiles essentielles d'origan, cannelle et de girofle (28).

Cependant, le mot aromathérapie est un néologisme (ou l'aromathérapie est un nouveau mot) inventé en 1928 par le chimiste "René-Maurice Gattefossé", un pharmacien français. Ce terme servira de titre d'un ouvrage publié en 1937, dans lequel sont décrites les relations structure-activité des composantes aromatiques (28).

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

En 1918, l'intérêt de Gattefossé dans le domaine s'est présenté après que ce dernier se brûlait la main à cause d'une explosion dans son laboratoire. Il a eu alors le réflexe de faire plonger sa main dans un récipient contenant l'huile essentielle de Lavande vraie (29)(30).

Le résultat était satisfaisant, un soulagement immédiat et une cicatrisation de la plaie d'une rapidité déconcertante. C'est pour cette raison qu'il va consacrer de longues années de recherche à l'étude des propriétés des huiles essentielles (31). Après une décadence vers les années cinquante du au développement des drogues modernes, il a fallu attendre jusqu'à 1960 pour que le "Docteur Jean Valnet" reprenne les travaux de Gattefossé et publie des ouvrages de référence. Il crée la Société française de phytothérapie et d'aromathérapie, après avoir utilisé copieusement les plantes pendant la guerre d'Indochine en tant que chirurgien militaire(30).

Tous deux –Gattefossé et Valnet- sont considérés comme les pères de l'aromathérapie moderne.

À partir des années 1970, quelques avancées scientifiques et thérapeutiques sur les huiles essentielles, démontrées par des chercheurs et des médecins (tels que Valnet, Belaiche, Duraffourd, Sevelinge, Pellecuer, Penoël, Franchomme, Mailhebiau, etc.), ont permis à l'aromathérapie de se loger en tant que médecine de l'avenir et de sortir de son image d'utilisation issue de la tradition. Les chercheurs ont voulu lui donner une valeur scientifique en étudiant la composition des huiles essentielles et en attribuant aux molécules qu'elles contiennent des propriétés thérapeutiques (32).

III. Huile essentielle

III.1. Historique

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires.

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles H.E datent de l'an3000 avant J.C (33). Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses.

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

En Egypte, l'utilisation de baumes et résines aromatiques remonte à l'époque des pharaons : embaumement, momification et divers autres usages. Les grands prêtres et médecins égyptiens ont transcrit leurs connaissances sur des papyrus et leur savoir, a constitué le fondement de l'aromathérapie. Les connaissances égyptiennes ont été diffusées par les médecins grecs de la Rome Antique et par Hippocrate.

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec l'ère arabe de la civilisation, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques (34).

Le premier récit authentique écrit sur la distillation l'huile essentielle est attribué à Villanova, médecin catalan, entre 1235 et 1311 c'est à partir du 13eme siècle que les HE ont été introduites dans les pharmacies et leurs effets pharmacologique décrits dans les pharmacopées les pharmacopées mais leur utilisation ne semble pas avoir été très répandue en Europe qu'au début du 16eme siècle à Londres (35).

Au 17eme siècle, selon le médecin français Du Chesne, la préparation d'huiles essentielles était bien connue et les pharmacies stockaient environ une vingtaine d'huiles différentes.

À la fin du 18eme siècle et depuis la colonisation de l'Australie, l'utilisation de l'huile d'arbre à thé à des fins médicales a été documentée, mais il est probable qu'elle a été utilisée par les Australiens indigènes avant cette date (36).

Les premiers essais expérimentaux sur les propriétés bactéricides des vapeurs d'huiles essentielles ont été réalisés par De la Croix en 1881 (37).

Dans l'histoire moderne, les vertus thérapeutiques des huiles essentielles occupent une place de plus en plus importante. En 1928 le chimiste français René-Maurice Gatte fosse a utilisé le terme aromathérapie pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles lorsqu'il a découvert par accident que la lavande a guéri une brûlure à sa main. En 1964 le docteur français Jean Valunet a connu du succès en traitant des patients en médecine et en psychiatrie. (38)(39).

Toutefois, au cours des 19eme et 20eme siècles, l'utilisation d'huiles essentielles en

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

médecine progresse et depuis, l'aromathérapie en tant que médecine naturelle complémentaire, n'a cessé de gagner du terrain face au «tout chimique» et devient une pratique secondaire par rapport à leur utilisation pour leurs propriétés organoleptiques(40).

III.2. Définition et caractéristiques des huiles essentielles

L'huile essentielle appelée encore « essence » ou « essence aromatique végétale » est définie comme "un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation à sec. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques" AFNOR NF T 75-006 (AFNOR, 1980).

Selon AFNOR, il faut utiliser le terme « essence » alors que la pharmacopée française et la pharmacopée européenne utilisent le terme « huile essentielle ». C'est ce dernier terme qui a été retenu par les spécialistes en pharmacognosie. Contrairement à ce que suppose la dénomination, (41), AFNOR NF T 75-006 (AFNOR,1980).

L'HE est une substance complexe qui contient des molécules aromatiques dont l'action bénéfique sur la santé est étudiée et mise en pratique par l'aromathérapie. Elles combinent des molécules très variées qui se composent généralement de molécules a squelette carboné de 10 C a 15 C (en moyenne une centaine de molécules différentes pour une seule essence : terpènes, cétones, alcools, esters, aldéhydes...) (42).

Les HE sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites « fixes ». Leur densité est en grande majorité inférieure à celle de l'eau. Pour autant quelques HE font exception cette règle. C'est le cas du saffran, du girofle et de la cannelle (43).

Elles sont huileuses, mais non grasses et s'évaporent facilement. Chaque HE est unique et se caractérise par une odeur, une couleur, une viscosité et des propriétés spécifiques. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (44).

Elles sont solubles dans l'alcool et dans tout type de corps gras (liposolubles). Les HE sont entraînaibles à la vapeur d'eau, mais très peu solubles dans l'eau. Pour autant une fraction des composants des HE se solubilisent dans l'eau ce qui permet d'obtenir « les eaux florales » ou« eaux distillées végétales » (42).

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

Le terme « huile » revient à leur nature lipidique, leur immiscibilité avec l'eau et leur solubilité dans les solvants organiques. En outre, le terme « essentielle » provient du fait que ces huiles représentent le sang vital de la plante et agissent comme son système immunitaire. Ces huiles sont si essentielles à la plante qu'elle ne pourrait pas survivre sans elles (40).

Pour être de qualité optimale, une huile essentielle doit être 100% naturelle (c'est-à-dire non dénaturée par des molécules de synthèse chimique), 100% pure (c'est-à-dire non mélangée avec d'autres huiles essentielles ayant des caractéristiques proches) et 100% intégrale (c'est-à-dire que le distillateur aura recueilli la totalité des molécules contenues dans la matière végétale distillée). La détermination du chémotype permet de le garantir (45).

III.3. Importance économique des huiles essentielles

L'utilisation d'HE pour la parfumerie, d'additifs dans les confiseries alimentaires, ainsi que de produits pharmaceutiques et cosmétiques est une tendance croissante du marché (3% chaque année).

Une augmentation rapide a été observée dans le nombre de produits dérivés des huiles essentielles. L'industrie cosmétique utilise de nombreuses herbes et épices dans la fabrication de crèmes pour la peau, de baumes, de shampooings, de savons et de parfums. Les huiles essentielles sont également utilisées par les entreprises de boissons gazeuses et les entreprises agroalimentaires et elles ont occupé une place importante dans l'industrie des médicaments tout au long du XXe siècle (46).

Leur utilisation en tant que produits d'aromathérapie, systèmes de médicaments traditionnels et systèmes complémentaires de médicaments est en augmentation constante aux États-Unis, en Europe, en Afrique et dans les pays asiatiques. Les principaux composants de cette industrie valant des centaines de millions de dollars sont les produits pharmaceutiques, les suppléments médicinaux et les sociétés spécialisées dans les produits nutraceutiques(47)(48)(49).

L'énorme production d'HE (> 70 000 tonnes par an) est atteinte principalement par les principaux cultivateurs et producteurs comme les États-Unis, Brésil, Inde et Chine. De même, l'Australie, la Malaisie, l'Indonésie, Thaïlande, Sri Lanka, Afrique du Sud, Afrique, Égypte, France, Espagne, l'Italie, l'Allemagne, la Russie, le Népal, le Bangladesh et le Pakistan sont les importants contributeurs à la production mondiale de HE. Par exemple, vétiver / khus, huiles de girofle, citronnelle, basilic et céleri sont principalement produites en Inde, Espagne

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

et en France sont les principaux producteurs de rose-marie obtenue de *R.officinalis*. Le géranium et la rose géraniums sont obtenus à partir de *Pelargonium*sp. Qui sont originaires d'Afrique. L'huile de thé d'Australie et du Sud du Pays de Galles et la lavande d'Europe en sont d'autres exemples. Il n'est pas surprenant que ces pays représentent également le principal marché pour les OE (50).

Environ 300 HEs sont considérés comme très importants d'un point de vue commercial(51). Les huiles essentielles ayant la plus forte production et valeur marchande dans le monde pouvant être mentionnées, huile d'orange (*C. sinensis*), menthe de maïs (*Menthaarvensis*), menthe poivrée (*Menthasp.*), Eucalyptus (*E. globulus*), citronnelle (*Cymbopogon*sp.), Citronnelle (*C. limon*), de girofle (*S. aromaticum*) et de camphre (*C. camphora*). Viennent ensuite le basilic, la lavande, la sauge, le thym, camomille, absinthe, coriandre, fenouil, aneth, céleri, anis, huiles de jowan et de cumin (48)(50).

La valeur marchande de ces huiles peut varier en fonction du matériau source, de la pureté, de la composition et de nombreux autres facteurs. Cependant, en règle générale, le coût de l'huile d'anis et de l'huile de coriandre est estimé à environ 45 à 70 dollars le Kg. Comparativement, les huiles de calendula, de thym, d'aneth et de sarriette peuvent coûter très cher (c'est-à-dire plus de 250 \$ le Kg de poids de l'huile) (52).

Bon nombre d'entre elles pourraient être utilisées dans l'industrie des médicaments. En particulier, les HE obtenus à partir de plantes appartenant à des familles Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Poaceae, Rutaceae sont importantes du point de vue des applications médicinales(53).

En dehors de celles-ci, quelques autres familles telles que les Cupressaceae, les Hypericaceae (Clusiaceae), les Fabaceae (également connues sous le nom de Leguminosae), les Liliaceae, les Pinaceae, les Piperaceae, les Rosaceae, les Santalaceae et les Zygophyllaceae présentent un potentiel considérable. Il est nécessaire d'explorer les HE des membres de ces familles à des fins diverses, notamment en ce qui concerne les propriétés médicinales (53).

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

Tableau I: La production des huiles essentielles dans le monde

Huiles essentielles	Production (Tonnes)	Principaux pays producteurs
Huiles d'oranges	51000	USA. Brésil. Argentine
Huiles du citron	9200	Argentine. Italie. Espagne
Huiles de l'eucalyptus	4000	Chine. Inde. Australie. Afrique du sud
Huile de la menthe poivrée	3300	Inde. USA. Chine
Huile du clou de girofle	1800	Indonésie. Madagascar
Essence de la citronnelle	1800	Chine. Siri Lanka
Huile de la menthe verte	1800	USA. Chine
Huile du bois de cèdre	1650	USA. Chine
Huile de la lavande	1100	France

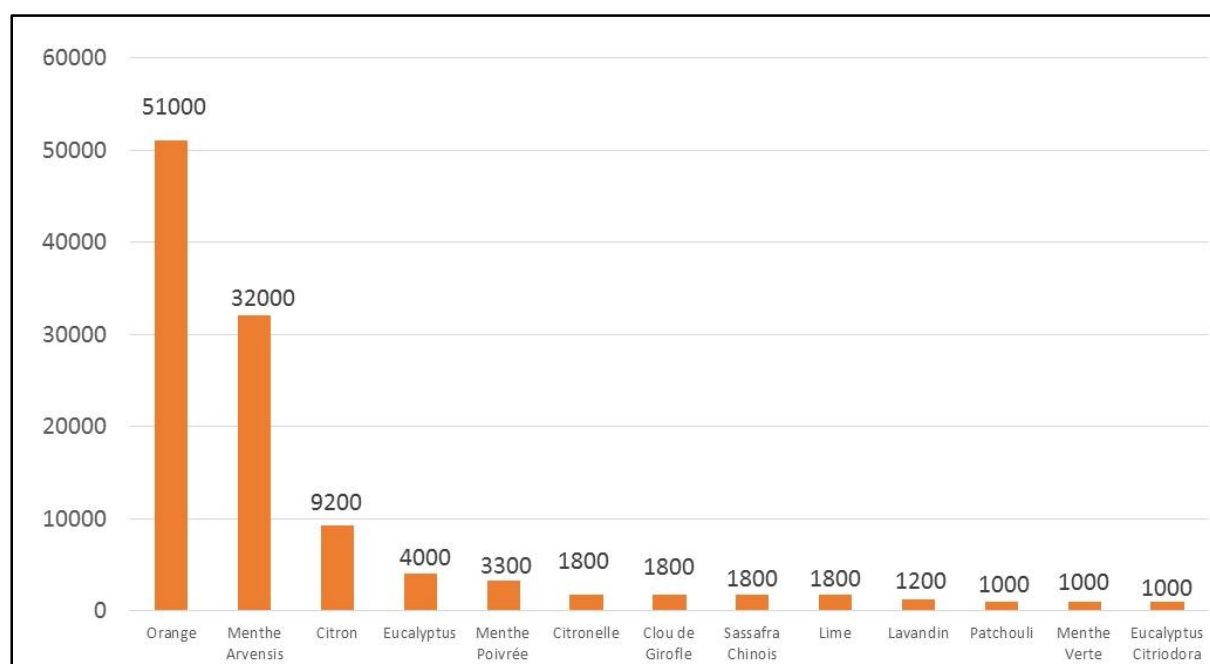


Figure 1:production mondiale des 13 plus importantes HE (en tonnes)(54).

III.4. Principaux domaines d'application

En raison de leurs diverses propriétés, les HEs sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance en effet elles sont

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie pour le pouvoir analgésique antiseptique antispasmodique apéritif antidiabétique en alimentation par leur activités anti-oxydante et leur effet aromatisant en parfumerie et en cosmétique pour leur propriété odoriférante.

➤ **Aromathérapie**

L'aromathérapie est une forme de médecine alternative dans laquelle les HEs ont une grande importance car elles induisent de nombreux effets curatifs. Ainsi elles s'utilisent de plus en plus dans diverses spécialités médicales telles que : la podologie, l'acupuncture, la masso-kinésithérapie, l'ostéopathie, la rhumatologie ainsi que dans l'esthétique. (55)

➤ **Agro-alimentaire**

En vertu de leurs propriétés antiseptiques et aromatisantes , les HEs sont employées quotidiennement dans les préparation culinaires (ail, laurier, thym,..).Elles sont également très prisées en liquoristerie (boisson anisées ,kummel)et en confiserie (bonbons ; chocolat).Leur pouvoir antioxydant leur permet de conserver les aliments en évitant les moisissures, conservation du smen par exemple par le thym et le romarin (56).

➤ **Cosmétologie et parfumerie**

Les HEs sont recherchées dans l'industrie des parfums et des cosmétiques en raison de leurs propriétés odoriférantes. L'industrie de la parfumerie consomme d'importants tonnages d'essences (60 %) en particulier celle de rose, de jasmin ,de violette, de verveine,...Les HEs sont aussi consommées en cosmétologie pour parfumer les produits cosmétiques : les dentifrices ,les shampoings, les crèmes solaires ,les rouges à lèvres, les savons ,etc. Les produits d'hygiène, détergents et lessive par exemple, consomment eux aussi beaucoup d'HEs pour masquer les odeurs (souvent peu agréables) des produits purs (57).

➤ **Pharmacie**

Les essences issues des plantes sont utilisées en grande partie dans la préparation d'infusion(menthe, verveine, thym) et sous de préparation galéniques .Plus de 40% de médicaments sont a base de composants actifs de plantes, par exemple gastralgine est un digestif antiacide qui se compose d'HEs de carvi (58).

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

III.5. Origine et localisation des huiles essentielles

Toutes les parties des plantes aromatiques, tous leurs organes végétaux, peuvent contenir de l'huile essentielle.

- Les fleurs : oranger, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées
- Les feuilles: eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin;
- Les organes souterrains: racines (vétiver, angélique), rhizomes (gingembre, acore) ;
- Les fruits: fenouil, anis, épicarpes des Citrus ;
- Les graines : noix de muscade ;
- Le bois et les écorces: cannelle, santal, bois de rose.

La synthèse et l'accumulation des HE sont généralement associées à la présence des structures histologiquement spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante

On retrouve par exemple (43):

- les **cellules à huiles essentielles** : chez les *Lauracées* et les *Zingiberacées*
- les **poils sécréteurs** : chez les *Lamiacées*
- les **poches sécrétrices** : chez les *Myrtacées* et les *Rutacées*
- les **canaux sécréteurs** : chez les *Apiacées* et les *Astéracées*.

Elles ont vraisemblablement un rôle défensif : protection du bois contre les insectes et les champignons, action répulsive contre les animaux herbivores.

La concentration dans les plantes est en général faible, aux alentours de 1 à 2% voire moins, mais il y a des exceptions comme le clou de girofle avec 15% d'huile essentielle ou la noix de muscade, 5-15%.

Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les labiateae (famille du thym, de la lavande, de la menthe, du basilic), les asteraceae (camomille,absinthe), les myrtaceae (eucalyptus, melaleuca, myrte, girofle), les lauraceae (cannelle,laurier) (59).

III.6. Fonction de l'huile essentielle dans la plante

L'existence des HE dans les végétaux même si leur fonction n'est pas toujours précisément connue, répondrait aux besoins d'une protection spécifique des espèces relative à leur environnement (43)(60).

- Les plantes étant immobiles, elles auraient développé les HE pour constituer une défense chimique contre les micro-organismes. Elles repoussent les parasites et protègent la plante de certaines maladies grâce à leurs propriétés antifongiques, antivirales, antibactériennes ou insectifuges.
- Elles se défendent également contre les autres plantes. Par exemple, *Erica cinerea*, la bruyère cendrée diffuse des substances télétoxiques afin d'éviter la pousse d'autres végétaux à proximité. (Une lande de bruyère ne comporte aucune autre végétation).
- Elles attirent les insectes pollinisateurs (fleurs parfumées, fécondées par certains insectes butineurs) et permettent ainsi à la plante d'assurer sa reproduction ;
- Elles aideraient à guérir blessures et attaques diverses auxquelles sont soumises les plantes.
- Elles remplissent une action de protection contre les brûlures solaires en conservant une humidité d'importance vitale pour la plante.
- Elles pourraient permettre aux plantes de communiquer entre elles. Par exemple, une plante attaquée par un herbivore pourrait envoyer des signaux d'alerte (substances volatiles comme hexénal ou l'ocimène) aux autres plantes du secteur, pour lesquelles déclenchent des mécanismes de défense.
- Elles représentent une réserve d'énergie mobilisable (ex. : en cas de conditions climatiques défavorables).

III.7. Composition chimique

Sur le plan chimique, les HE sont des mélanges de structure extrêmement complexes, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes, (myrcène, β -pinène, γ -terpinène) et les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène) (61).

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

➤ Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leurs squelette d'unités isoprénique à 5 atomes de carbone (C₅H₈). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en **monoterpènes** formés de deux isoprènes (C₁₀H₁₆), **les sesquiterpènes**, formés de trois isoprènes (C₁₅H₂₄), **les diterpènes**, formés de quatre isoprènes (C₂₀H₃₂). **Les tetraterpènes** sont constitués de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. **Les polyterpènes** ont pour formule générale : (C₅H₈)_n ou n peut être de 9 à 3.

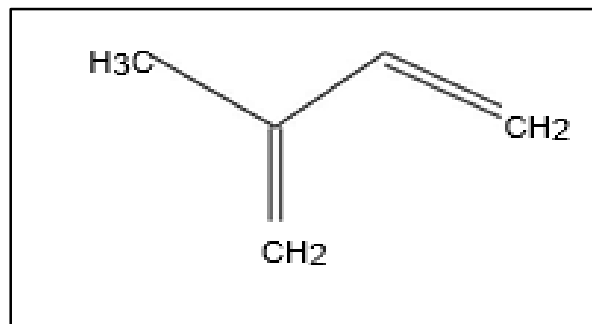


Figure 2 : Représentation d'une unité isoprène.

Les térpénoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool,aldéhydes, cétone, acide) (51).

➤ Les monoterpènes

Sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des H.E, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acyclique (myrcène,o-cymène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène) (41).

Propriétés thérapeutiques :

Les HE contenant majoritairement des monoterpènes ont, en général, des propriétés tonifiantes, antimicrobiennes et stimulantes au niveau digestif (62).

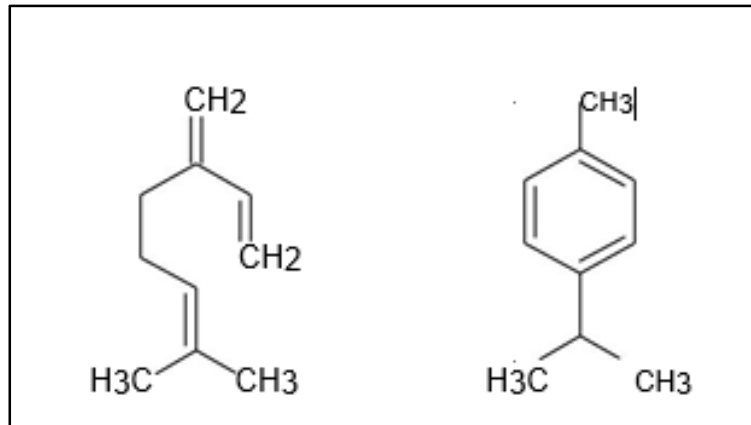


Figure 3: Structure d'un monoterpène acyclique à gauche (myrcène) et d'un monoterpène cyclique à droite (p-cimène)

- **Les sesquiterpènes** il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple : β -caryophyllène, β -bisabolène, α -humulène, α -bisabolol, farnésol (63).

Principales propriétés thérapeutiques :

Les HE contenant majoritairement des sesquiterpènes ont, en général, des propriétés anti-inflammatoires et antiallergiques (29).

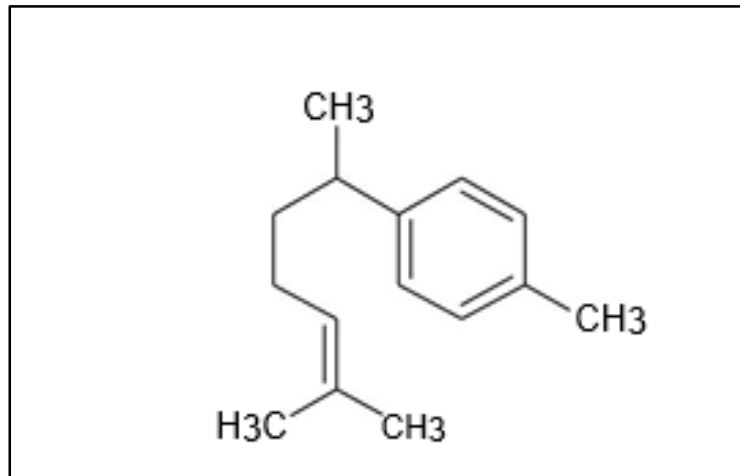


Figure 4: Structure générale d'un sesquiterpène

- **Les dérivés terpéniques fonctionnalisés**
- **Les alcools acycliques, monocycliques ou bicycliques**

Ils ont un suffixe en **-ol** qui indique le rattachement d'un groupement hydroxyle à l'un des carbones de la structure terpénique. Ils peuvent être acycliques (géraniol), monocycliques (menthol) ou bicycliques (bornéol) (43).

Principales propriétés thérapeutiques:

Les HE contenant majoritairement des alcools terpéniques ont, en général, des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et antiparasitaires (62).

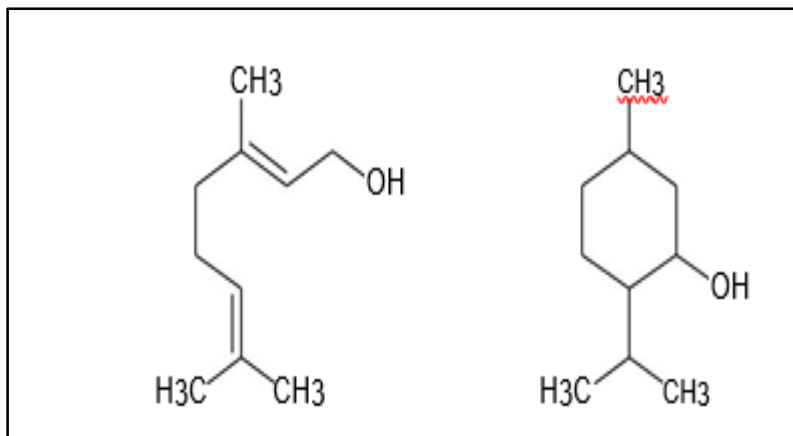


Figure 5:Exemples d'un alcool acyclique à gauche (géranol) et d'un alcool cyclique à droite (menthol).

➤ Les aldéhydes terpéniques

Les aldéhydes ont un suffixe en **-al** qui indique le rattachement d'un carbonyle à l'un des carbones de la structure moléculaire ainsi que la fixation d'un atome d'hydrogène à ce même carbone (64).

Principales propriétés thérapeutiques:

Les HE contenant majoritairement des aldéhydes terpéniques ont, en général, des propriétés anti-inflammatoires, antalgiques et sédatives. Elles sont employées pour soulager les pathologies articulaires, rhumatismales ou tendineuses mais également pour les pathologies affectant le système nerveux (29).

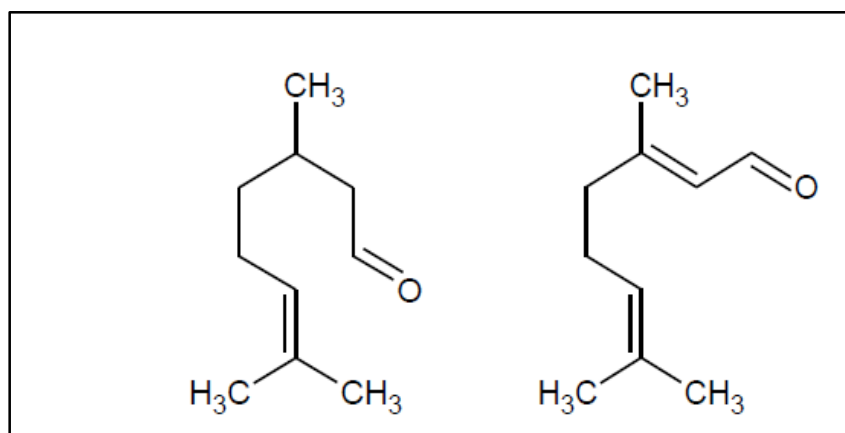


Figure 6:Structure du néral (à gauche) et du géranial (à droite).

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

➤ Les cétones terpéniques

Les cétones ont un suffixe en **-one** qui indique la présence d'un carbonyle dans la structure. Contrairement aux aldéhydes, il n'y a pas d'atome d'hydrogène relié au carbone (64).

Principales propriétés thérapeutiques:

Les HE contenant majoritairement des cétones terpéniques ont, en général, des propriétés mucolytiques, antifongiques et antivirales (62).

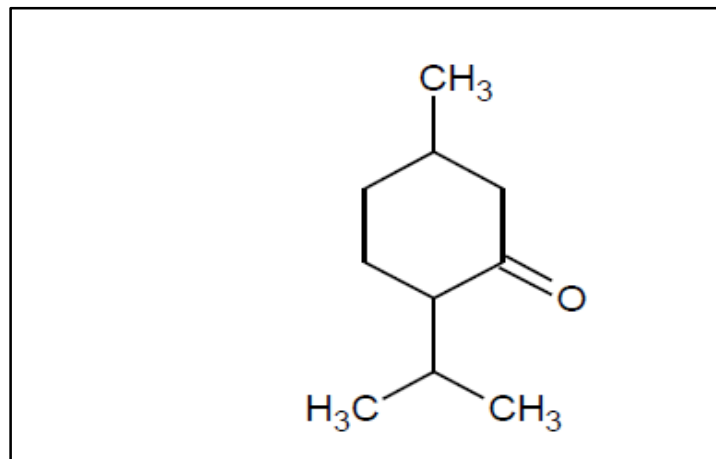


Figure 7: Structure de la menthone, une cétone terpénique.

➤ Les oxydes terpéniques

Les oxydes terpéniques sont fréquemment présents dans les HE. Il s'agit d'éthers (64).

Principales propriétés thérapeutiques:

Les HE contenant majoritairement des oxydes terpéniques ont, en général, des propriétés mucolytiques, expectorantes, antibactériennes et antivirales. Elles sont utilisées pour soulager les infections se répercutent sur la sphère respiratoire (29).

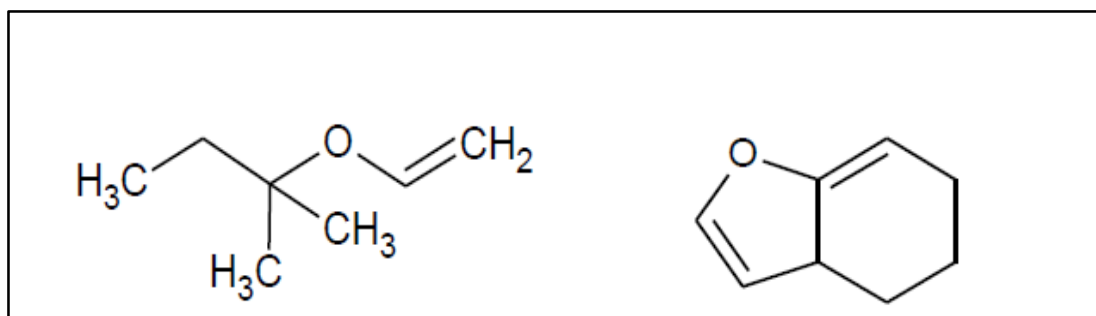


Figure 8: Structure d'un oxyde terpénique aliphatique à gauche et cyclique à droite.

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

➤ Les esters terpéniques

Les esters terpéniques résultent de la réaction chimique entre une fonction alcool et une fonction acide entraînant la perte d'une molécule d'eau. Ils s'écrivent de la façon suivante: acide carboxylique-**ate**de alcool-**yle**(*i.e.*: acé**ate** de benz**yle**), ainsi cette dénomination permet d'identifier les alcools et acide carboxylique formant l'ester (64).

Principales propriétés thérapeutiques

Les HE contenant majoritairement des esters terpéniques ont, en général, des propriétés antispasmodiques, antalgiques, anti-inflammatoires et sédatives (29).

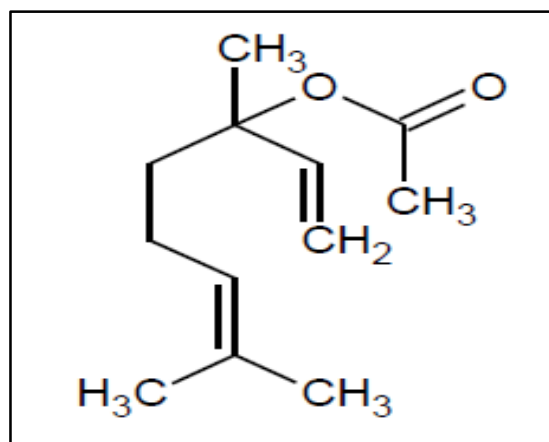


Figure 9:Structure d'un ester terpénique : l'acétate de linalyle.

➤ Les phénols terpéniques

Les phénols terpéniques possèdent une fonction hydroxyle fixée sur un noyau benzénique. Ce sont les constituants majoritaires des HE après les terpènes. Les phénols ont un suffixe en **-ol** (64).

Principales propriétés thérapeutiques:

Les HE contenant majoritairement des phénols terpéniques ont, en général, des propriétés antibactériennes, antivirales, antifongiques et antiparasitaires. Elles sont aussi généralement antioxydantes et stimulantes (29).

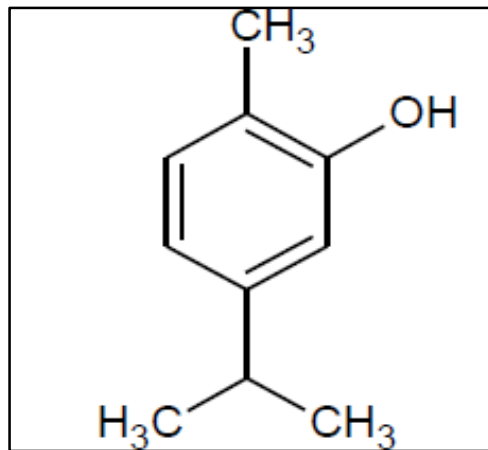


Figure 10:Structure d'un phénol terpénique, le carvacrol.

➤ Les lactones terpéniques

Quelques plantes aromatiques (matricaire ou achillée millefeuille) renferment, en quantité infime, des lactones terpéniques mais dans la majeure partie des cas, ces lactones sont dégradées au cours du procédé d'hydro-distillation. Les lactones sont des esters cycliques. Cette cyclisation leur confère des propriétés différentes de celles des esters terpéniques (65).

Principales propriétés thérapeutiques :

Les HE contenant des lactones terpéniques ont, en général, des propriétés antibactériennes (notamment à l'encontre des bactéries à Gram positif), antifongiques et antiparasitaires . Le chamazulène (produit de dégradation de la matricine lors de l'hydrodistillation, possède également *in vivo* des propriétés anti-inflammatoires (66).



Figure 11:Structure générale des lactones terpéniques

➤ Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C6-C3) ou composés phénoliques s'agissant le plus fréquemment des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes. La biosynthèse par voie phényl propanoïdes débute par des aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine, Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixe à un

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

cyclephényle. Également, la synthèse de ces constituants nécessite une série d'acides dont l'acide shikimique et l'acide cinnamique. Les phénylpropanoïdes sont moins représentés dans l'HE que les terpènes, néanmoins elles sont caractéristiques dans certaines huiles essentielles d'Apiaceae : (anis, fenouil, persil, cannelles (eugénole, myristicine, asarone, cinnamaldéhyde) (41).

Principales propriétés thérapeutiques:

Les HE contenant des composés aromatiques ont, en général, des propriétés anti-infectieuses à large spectre d'action. Elles sont à la fois antibactériennes, antivirales, antifongiques et antiparasitaires(29).

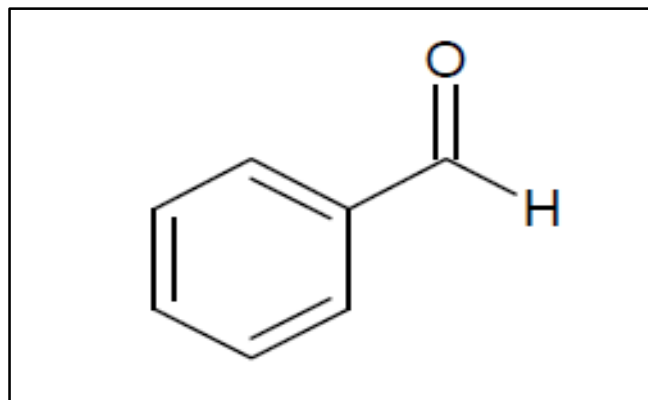


Figure 12: Structure générale d'un aldéhyde aromatique

➤ Composés d'origine diverses

Il s'agit de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles (composés issus de la dégradation d'acides gras ou d'autres composés).

Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en renfermer ces types de composés. Il en est de même pour les huiles essentielles lorsqu'elles sont entraînés par la vapeur d'eau (43).

III.8. Facteurs influençant la composition chimique

Étant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories :

III.8.1. Les facteurs extrinsèques

Les facteurs de l'environnement ont un impact direct sur la composition des HE. Cela se confirme d'autant plus avec les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles comme les poils sécréteurs des Lamiacées (basilic, lavandes, menthe, thym...). Ces espèces sont très susceptibles aux variations de températures, d'humidité, de régimes des vents, de durée totale d'insolation... Au contraire, les plantes ayant des structures aromatiques plus en profondeur présentent une qualité beaucoup plus constante (43).

➤ **Le mode de récolte ou de culture**

Les conditions de culture, de récolte, de séchage, de fragmentation et de stockage ont une action déterminante sur la qualité de végétaux. Ces dernières sont, dans la mesure du possible, exemptes d'impuretés telles que la terre, les poussières, les souillures, ainsi que d'infections fongiques. Elles ne doivent pas présenter des signes de pourriture ou d'endommagement (42).

Le mode de récolte indique également si la plante est sauvage ou cultivée, si la récolte se fait de manière manuelle ou mécanisée et si elle est issue ou non d'une culture biologique. Tous ces paramètres jouent un rôle important dans l'aspect qualitatif et quantitatif de l'HE obtenue (42).

La culture conventionnelle emploie des engrais et des produits phytosanitaires qui peuvent être présente dans l'huile essentielle car ils se condensent de la même manière que les principes aromatiques par contre La culture biologique respecte le cahier des charges établi par l'agriculture biologique (42).

➤ **Le procédé d'extraction**

L'huile essentielle obtenue par hydro-distillation est souvent, d'une composition différente de celle qui existe initialement dans la plante. En effet, au cours de l'extraction, les constituants des huiles essentielles connus pour être fragiles, sont soumis aux effets combinés d'un milieu aqueux, de son acidité et de sa température, et peuvent subir des conversions chimiques (67).

➤ **L'origine géographique**

Il y a des différences de composition chimique selon le pays d'origine.

Une même plante grandissant dans des lieux différents avec changement de situation géographique (altitude et latitude), avec variation de la nature du sol, peut produire des huiles essentielles différentes (68). Par exemple, le thym vulgaire à géraniol ne produit cette molécule de géraniol qu'en hiver alors que l'acétate de géranyle la remplacera en été (69).

III.8.2. Facteurs intrinsèques

Liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée :

➤ Le stade de développement botanique

On parle de **cycle végétatif**. Pour une espèce donnée, la proportion des différents constituants d'une HE peut varier tout au long du développement. C'est pour cela que toutes les plantes aromatiques ne sont pas cueillies au même stade. Des variations parfois très importantes sont couramment observées dans certaines espèces, par exemple pour la coriandre où la teneur en linalol (alcool) est 50% plus élevée chez le fruit mûr que chez le fruit vert (26).

➤ L'organe producteur

Les cellules productrices d'huile essentielle pouvant se situer dans différents organes, Il est possible d'obtenir différentes huiles selon les parties sélectionnées d'une même plante.

Des travaux de recherche ont montrés des différences de composition des huiles essentielles en raison d'organes différents (feuilles et fleurs)(70).

➤ L'origine botanique

Composition d'une H.E varie en fonction de l'espèce productrice. En effet, l'extraction de l'H.E d'un même organe de deux plantes différentes ne donne pas la même composition chimique, par exemple deux espèces de sauge : la sauge officinale (*Salvia officinalis*) et la sauge sclarée (*Salvia sclarea*), qui peuvent être vendues toutes les deux sous l'appellation d'essence de sauge. La première, riche en cétones neurotoxiques, peut provoquer des crises d'épilepsie, alors que la seconde possède des esters aromatiques anti-épileptisant (26).

➤ Existence de chemotypes (chimiotypes)

C'est un facteur très fréquent chez les plantes à huiles essentielles. En effet, pour une même espèce on peut rencontrer plusieurs chemotypes : l'exemple du thym avec ses sept races chimiques est très frappant (40).

III.9. Les chémotypes des huiles essentielles

Le chémotype d'une huile essentielle est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'huile essentielle. C'est l'élément qui permet de distinguer une huile essentielle extraite d'une même variété botanique mais d'une composition biochimique différente (71).

Cette classification capitale permet de sélectionner les huiles essentielles, pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Nous connaissons par exemple sous la même appellation botanique, deux grandes familles de thym, subdivisées elles-mêmes grâce à la définition de leurs chémotypes respectifs (71).

De nombreuses huiles comprennent plus d'un chémotype. La sauge sclarée (*Salvia sclarea*) par exemple, contient 250 molécules différentes, dont 75 % issues de la famille des esters et 15 %, de celle des monoterpénols. Les molécules travaillent en synergie, ce qui explique la polyvalence des huiles essentielles et leur vaste spectre d'action.

Une fois que l'on connaît les propriétés des chémotypes ainsi que leur concentration dans une huile essentielle, on peut déterminer quels seront les effets de celle-ci, bienfaisants ou dangereux (71).

Enfin, il faut savoir qu'une même plante peut inclure diverses espèces, dont chacune possédera des chémotypes différents. La lavande (*Lavandula*), par exemple, compte plusieurs espèces dont les *officinalis*, les *stoechas* et les *latifolia* : c'est donc le nom latin complet qui nous permet de savoir de quelle plante exacte il s'agit. Le lieu de culture (climat, altitude, composition du sol) peut aussi influencer la composition chimique d'une plante (71).

III.10. Les techniques d'extractions des huiles essentielles

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique (72). Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants.

Les huiles essentielles sont obtenues à partir de la matière première d'origine végétale par diverses méthodes d'extraction (73)(74); ces méthodes peuvent être classées en deux catégories : les méthodes conventionnelles (classiques) et les méthodes avancées (innovantes). L'investigation dans les nouvelles technologies (ultrasons, micro-ondes) pendant ces

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

dernières décennies a conduit à l'émergence de nouveaux processus d'extraction plus efficaces (réduction du temps d'extraction et de l'énergie de consommation, augmentation du rendement d'extraction, amélioration de la qualité des HE).

III.10.1. Méthodes conventionnelles et classiques

Il s'agit de méthodes conventionnelles basées sur la distillation de l'eau par chauffage pour récupérer les HE de la matrice végétale.

a. Hydro-distillation

Elle est de loin le procédé le plus répandu, car il convient à la majorité des plantes c'est la méthode normalisée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle qualité.

Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique (75).

La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotrope. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures.

Ainsi le mélange azéotrope « eau + huile essentielle » distillé à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées, la vapeur d'eau ainsi restée de ces essences est envoyée dans un compartiment pour y refroidir. Là, la vapeur redevient donc liquide et les huiles s'en désolidarisent (elles flottent à la surface). On les récupère alors par décantation(21).

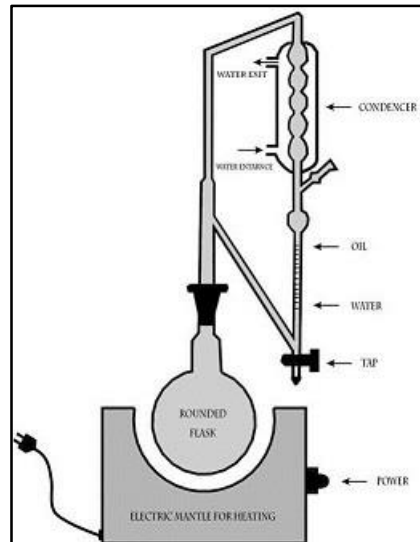


Figure 13:Schéma de l'hydro-distillation par cleverger.

b. Hydro-distillation à la vapeur

L'hydro-distillation à la vapeur ou l'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles (76). À la différence de l'hydro-distillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter.

L'extraction se fait à l'intérieur de l'alambic sauf qu'il y a un système de plaque perforée ou de grille qui maintient la plante en suspension au-dessus de la base de l'alambic contenant l'eau qui évite leur contact direct. L'extraction se fait par injection de vapeurs d'eau qui traversent la matière végétale du bas vers le haut et détruisent la structure des cellules végétales et transportent les matières volatiles. Les artefacts sont minimisés. Le temps d'extraction est réduit ainsi que la perte de molécules polaires.

c. Distillation à la vapeur

Cette méthode a les mêmes principes et avantages que l'hydro-distillation à la vapeur, mais la génération de vapeurs se produit en dehors de l'alambic de distillation (76). La vapeur peut alors être saturée ou surchauffée à une pression légèrement supérieure à la pression atmosphérique, la vapeur est introduite dans la partie inférieure de l'extracteur et passe donc à travers la charge de la matière première. Cette technique évite certains artefacts par rapport à l'hydro-distillation.

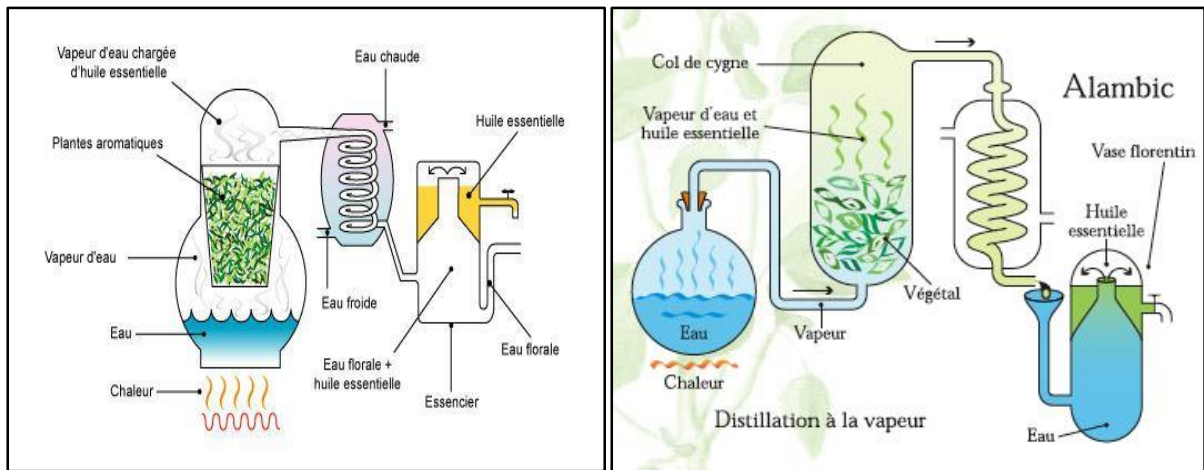


Figure 14: schéma représentative de l'hydro-distillation et de la distillation à la vapeur.

d. L'hydro-diffusion :

Il s'agit d'un cas particulier de la distillation à la vapeur où le flux de vapeur se produit vers le bas. Il est également appelé hydro-diffusion vers le bas ou hydro-diffusion et gravité (77).

e. Extraction aux solvants organiques

Cette méthode d'extraction est basée sur les propriétés physiques des essences aromatiques qui sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite.

L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants et leur manque de sélectivité peuvent entraîner de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines) dans le mélange pâteux et imposer par conséquent une purification ultérieure (78).

Le solvant choisi, en plus d'être autorisé, devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène. Sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait (79).

f. Pression à froid

Le pressage à froid est la méthode traditionnelle pour extraire les HE du zeste d'agrumes. Pendant l'extraction, les sacs d'huile se brisent et libèrent les huiles volatiles localisées dans la partie externe du mésocarpe (huiles de sacs ou huile de la glande). Cette huile est éliminée

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

mécaniquement en pressant à froid et en émulsion aqueuse. L'huile est récupérée ultérieurement par centrifugation (80). Dans ce cas, nous obtenons l'essence végétale du zeste d'agrumes qui est utilisé dans les industries alimentaires et pharmaceutiques comme additifs aromatisants (industrie alimentaire, cosmétiques et certains produits de soins de maison).

g. L'enfleurage :

La procédure met à profit la liposolubilité des composés odorants des végétaux dans les corps gras et qui permet l'exploitation des organes fragiles.

Le matériel végétal est mis en contact avec des graisses, ces dernières ayant une forte affinité avec les composés odorants, cette méthode peut être réalisée à froid ou à chaud, et on obtient ainsi des absolues de pommade (18).

➤ **L'enfleurage à froid**

Ce processus d'extraction, n'est plus trop utilisé, est réservé aux huiles florales de très grande qualité. Les senteurs particulièrement délicates peuvent également être capturées par enfleurage dans de la graisse froide. Pour ce faire, le mieux est de suspendre simplement les plantes dans un linge immergé dans de l'huile froide et de changer celui-ci après 12 à 24 heures. Pour pouvoir utiliser la fragrance à la fin, il convient de la délayer de la graisse avec de l'alcool puis de distiller finalement cet alcool selon ses besoins afin de concentrer d'avantage la senteur.

L'enfleurage constitue en quelque sorte la part royale dans le domaine de la confection de parfums, car il permet également de préserver des senteurs particulièrement délicates dans leur haute qualité et leur pureté. La macération dans l'alcool est sensiblement plus simple et moins dispendieuse ; toutefois, cette méthode n'est en rien comparable à l'extraction des senteurs par enfleurage au niveau de la qualité (81).

➤ **L'enfleurage à chaud**

Alternativement à la macération, il est également possible de procéder par l'enfleurage à chaud dans la graisse. Pour cela, il convient de chauffer une graisse animale clarifiée (à défaut de la vaseline ou de la paraffine, substances plus modernes) dans une chaudière en cuivre à 60 degrés. Les plantes y sont incorporées et détremées pendant 12 à 24 heures. Afin d'obtenir un résultat de qualité, il faut pressurer les plantes et remplir de nouveau la chaudière. Ce processus est répété autant de fois que nécessaire pour assurer le passage d'un maximum d'arômes dans la graisse. Ensuite une opération de filtration est nécessaire pour séparer la

graisse des fleurs. Une pâte parfumée appelée « pommade » qui va être traitée avec la même technique d'extraction que pour un enfleurage à froid (81).

III.10.2. Méthodes innovantes d'extraction des huiles essentielles

Un des inconvénients des techniques conventionnelles est lié à la thermolabilité des composants des HE qui subissent des altérations chimiques (hydrolyse, isomérisation, oxydation) dues aux températures élevées appliquées. La qualité des HE est donc extrêmement endommagée, surtout si le temps d'extraction est long. Il est important que les méthodes d'extraction puissent maintenir la composition chimique des HE et la proportion naturelle tel son état d'origine. Les nouvelles techniques d'extraction doivent également réduire le temps d'extraction, la consommation d'énergie, l'utilisation des solvants et l'émission du CO₂ (77).

a. Extraction au CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé : le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique (P = 73,8 bars et T = 31,1 °C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation (82).

En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatils.

Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60 °C et 60 bars (83).

Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante (84).

b. Extraction assistée par ultrasons

Cette technique a été développée en 1950 à l'échelle du laboratoire(85). L'échographie permet en combinaison avec d'autres techniques (hydro distillation et extraction au solvant) une intensification et une sélectivité de l'extraction des HE en accélérant leur libération par les plantes.

La matière première végétale est immergée dans de l'eau ou dans un solvant et en même temps soumis à l'action de l'échographie. Cette technique a été utilisée pour l'extraction de nombreux HE, en particulier des graines (86). Cependant, elle a été développée en particulier pour l'extraction de certaines molécules d'intérêt thérapeutique(87). Les ondes ultrasonores utilisées ont une fréquence de 20 KHz – 1 MH. Cela induit des vibrations mécaniques des parois des membranes d'extraits de plantes induisant une libération rapide des gouttelettes d'HE (85).

c. Extraction au CO₂ sub-critique :

L'état sous-critique du CO₂ est obtenu lorsque la température est entre 31°C et 55°C et une pression comprise entre 0,5 MPa et 7,4 MPa. Dans ces conditions, le CO₂ se comporte comme un solvant non-polaire (88). Cette méthode évite les dégradations observée dans la distillation à la vapeur ou l'entraînement par la vapeur due à des températures élevées et à la présence d'eau (89). L'extraits obtenus par cette technique présentent des saveurs très similaires à celles des matières premières végétales fraîches.

d. Hydro-distillation par micro- ondes sous vide

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (Solvent Free Microwave Extraction) a été conçue pour des applications en laboratoire pour l'extraction d'huiles essentielles de plantes aromatiques (90). Cette technologie est une combinaison de chauffage micro-ondes et d'une distillation à la pression atmosphérique.

Basée sur un principe relativement simple, cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes, sans ajout de solvant organique ou d'eau. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante, permet la rupture des glandes renfermant l'huile essentielle.

Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, par la suite facilement séparable par simple décantation. D'un point de vu qualitatif et quantitatif, le procédé SFME

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

semble être plus compétitif et économique que les méthodes classiques telles que l'hydrodistillation ou l'entraînement à la vapeur (91).

La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par microondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées(92)(93). Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (91).

III.11. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles

Une connaissance optimale de la composition chimique des huiles essentielles est nécessaire aux industriels pour pouvoir contrôler la qualité et la régularité afin d'avoir une bonne commercialisation et afin de y déceler une éventuelle spécificité en vue de sa valorisation. En effet, ces huiles essentielles sont souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries pharmaceutiques et de l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des huiles essentielles demeure une étape importante qui puis est malgré les développements constants des méthodes de séparation et d'identification, reste une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques(94);(95). Le double objectif identification/quantification consiste à déterminer la composition chimique de chaque huile essentielle et extraits par différentes méthodes analytiques spectroscopique et/ou chromatographiques. De manière conventionnelle, l'étude de la composition chimique d'un mélange naturel complexe peut être réalisée selon différentes voies :

La première séquence consiste à analyser les huiles essentielles, tout d'abord, par Chromatographie en Phase gazeuse (CPG) ; cette technique chromatographique permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir), puis à les analyser par le couplage « en ligne d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la spectrométrie de masse (SM) ou, quelques fois, la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF). L'identification est ensuite faite par comparaison des indices de rétention Ir et des données spectrales (spectres de masse ou infrarouge) des

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques des spectres. Cette étape est généralement suffisante dans les cas d'analyse de routine d'huiles essentielles. Une deuxième séquence est réalisée lorsque l'huile essentielle est complexe ou qu'elle contient des composés pouvant couler ou encore lorsque l'analyse est réalisée dans le cadre de la recherche. Un fractionnement de l'huile essentielle est alors effectué, le plus souvent par chromatographie liquide sur colonne ouverte de silice ou d'alumine. Les fractions résultantes sont ensuite analysées comme décrit dans la première séquence.

Cette étape est préférable lorsque l'on veut étudier les différentes familles de composés (esters, alcools, cétones...).

Enfin, une troisième séquence peut être mise en œuvre lorsqu'un ou plusieurs constituants de l'huile essentielle sont inconnus des bibliothèques de comparaison et qu'ils ne sont pas décrits dans la littérature. Il est alors nécessaire de les purifier par distillation fractionnée ou par des techniques chromatographiques préparatives telles la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), la Chromatographie liquide sur Colonne ouverte (CC), la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) ou encore la Chromatographie en Phase Gazeuse Préparative (CGP). L'objectif est d'aboutir à leur identification structurale par les techniques spectroscopiques usuelles : Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN-¹H) et du carbone-13 (RMN-¹³C), SM, IRTF, etc... (96).

a. Le couplage CPG-SM

D'un certain point de vue analytique, d'important progrès ont été atteints en couplant la CPG avec un spectromètre de masse (SM). En effet, le couplage CPG-SM en mode impact électronique (IE), dit CPG-SM(IE), est la technique utilisée habituellement pour l'analyse dans le domaine des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales(97)(98) .

Néanmoins, il faut utiliser les bibliothèques commerciales avec précaution, car malgré leurs utilités, elles ne sont pas les plus performantes. Réellement et compte tenu de la diversité et

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

du nombre très important de composés qu'elles contiennent, il est bien rare qu'une interrogation n'obtienne pas de réponse ; même si cette proposition d'identification est attachée à une note de concordance très moyenne. C'est pourquoi, les bibliothèques faites avec des spectres de masse enregistrés avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques, restent les plus performantes et permettent des identifications plus fiables.

Ceci est considérablement vrai pour l'analyse des huiles essentielles comprenant un grand nombre de sesquiterpènes, qui, construits à partir d'un même synthon isoprénique, présentent des spectres de masse souvent identiques ou insuffisamment différenciés.

En fait, dans la pratique, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse (utilisation conjointe de banques laboratoire et littérature) et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, généralement l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes comme les huiles essentielles (99)(100). Ainsi, Vernin et collaborateurs (101), d'une part Cavaleiro (102) d'autre part ont mis a jour un logiciel permettant de combiner les résultats de la spectrométrie de masse avec les valeurs des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire.

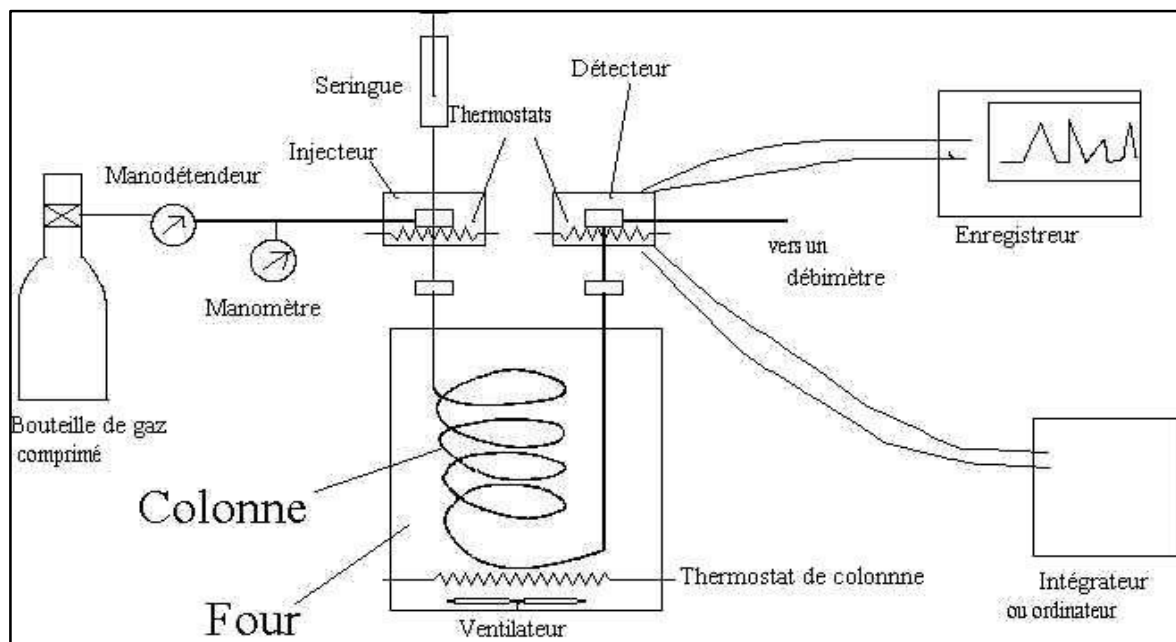


Figure 15: Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse(39).

b. Spectroscopie infrarouge a transformée de fourier (IRTF)

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) a pour concept l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, de réaliser l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau (103).

- **Principe**

Quand la longueur d'onde (l'énergie), apportée par le faisceau lumineux, est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière absorbera le rayonnement et on constatera une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} ($2.5 - 25\ \mu\text{m}$) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

Toutes les vibrations ne donnent forcément pas lieu à une absorption, car cela va dépendre de la géométrie de la molécule d'un côté et surtout de sa symétrie d'un autre côté. Pour qu'une géométrie donnée détermine les modes de vibration actifs en infrarouge grâce à la Théorie des Groupes, la position de ces bandes d'absorption va tenir compte en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse.

C'est pourquoi un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

L'analyse se réalise à l'aide d'un spectromètre à Transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption. La figure décrit le schéma d'un spectromètre à Transformée de Fourier.

Le faisceau infrarouge qui émerge de la source A est orienté vers l'interféromètre de Michelson qui modulera chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente.

Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur la Séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinent, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme (Figure n°16), c'est à dire une signature de l'intensité en fonction de la position du miroir. L'interférogramme est la somme de toutes les fréquences du faisceau. Cet interférogramme est ensuite converti en un spectre infrarouge par une opération mathématique appelée transformée de Fourier (103).

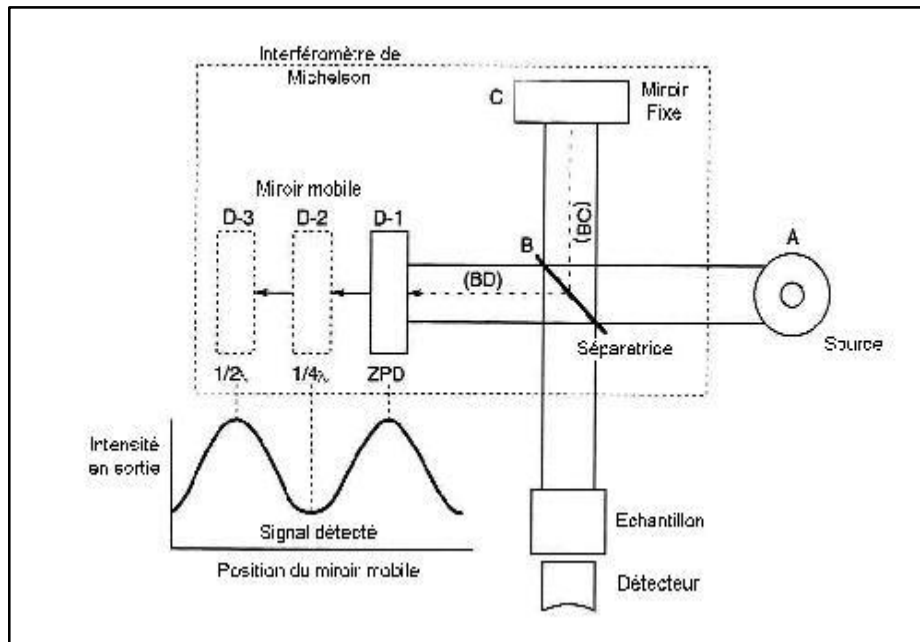


Figure 16:Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier (103).

III.12. Propriétés biologiques et pharmaceutiques

➤ Activité antimicrobienne

Il a été constaté que la gravité des infections bactériennes a augmenté et cela même après la découverte de nombreux antibiotiques, due principalement à l'émergence d'antibio-résistantes, et l'augmentation de la population à immunité réduite et l'incidence accrue d'infection à biofilms résistants aux médicaments. et donc, les maladies infectieuses induites par des bactéries demeurent l'une des principales causes de décès(104). En outre, la toxicité due aux effets secondaires limite l'utilisation prolongée de fortes concentrations d'antibactériens disponibles. Il est primordiale d'explorer de nouvelles molécules et approches alternatives contre les bactéries pathogènes (105).

Les molécules végétales sont bien connues pour leurs propriétés antimicrobiennes. En particulier, il a été démontré que les HE présentent une activités inhibitrices à large spectre contre divers bactériens pathogènes Gram positifs et Gram négatifs (106)(107)(49).

L'efficacité antibactérienne peut varier avec les huiles ainsi qu'avec différentes bactéries. Par exemple, le santal (*Santalum album*), l'huile de manuka (*Leptospermum scoparium*) et le vétiver (*C. zizanioides*) sont très actifs contre les bactéries à Gram positif, mais n'ont pas d'activité contre Gram négatif (53).

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

Par rapport à d'autres bactéries, *Pseudomonas aeruginosa* présente une tolérance à l'inhibition par les HE. En général, l'HE du thym, d'origan, d'arbre à thé, cannelle, citronnelle, laurier, citron myrte, clou de girofle sont les plus puissants antimicrobiens . Ils sont actifs à des concentrations <1% vol / vol, c.-à-d. Qu'ils présentent des CMI <1% clou de girofle, citronnelle, origan et le thym inhibent la croissance d'*Escherichia coli* à des concentrations de 0.02, 0.04, 0.06, et 0.05% respectivement (53)(108).

Thym, romarin, menthe poivrée, citronnelle, et clous de girofle inhibent la croissance de *Staphylococcus aureus* à des concentrations $\leq 0,05\%$, alors que HE de basilic et d'eucalyptus l'inhibent à une concentration de 1% (109)(53). L'ail, le citron, et le thé sont actifs contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) (110)(111).

Dans certains cas un Il a été observé que la molécule constitutive majeure possède une activité meilleure que celle de la HE. Par exemple, le carvacrol et l'eugénol provenant de l'huile de *S.aromaticum* (clou de girofle) ou terpinen-4-ol du *M.alternifolia* (arbre à thé) présentent une plus grande efficacité qu'une huile particulière. En règle générale, Les HE contenant des composés phénoliques et des aldéhydes présentent un meilleur activité antibactérienne(112)(113).

Mécanismes d'action antibactérienne:

Les mécanismes par lesquels les HE exercent leur activité antibactérienne sont mal connus. Du fait de la complexité de leur composition chimique, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des HE. Probablement que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (114). Burt (115) a émis que la caractéristique importante des HE est attribuée à l'hydrophobicité de certains de ces composants qui leur permet de traverser facilement la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire en altérant sa perméabilité et entraînant des pertes anormales d'ions, voire même des macromolécules (108), suggère que, l'action des HE sur la prolifération microbienne se fait à travers l'altération de la perméabilité membranaire des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie.

Le mode d'action des HE dépend essentiellement du type de microorganismes. En règle général, les bactéries Gram négatifs sont plus résistantes que les bactéries Gram positifs grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatifs est

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer (116).

➤ **Activité antifongique**

Les infections fongiques sont très fréquentes dans notre société. Cette extension est largement favorisée par la prescription abusive d'antibiotiques, issus en premier lieu de champignons microscopiques. Les groupes de molécules aromatiques citées comme antibactériens sont également actifs sur les champignons.

Les constituants actifs sont : les phénols monoterpéniques et aromatiques, les alcools monoterpéniques, des aldéhydes aromatiques et monoterpéniques, les lactones...

Par exemple :

- *Candida albicans* est sensible aux HE d'Origan, de Cannelle de Ceylan, de Thym vulgaire à thymol.
- *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* (onychomycose « pied d'athlète ») est sensible aux HE de Sarriette et d'arbre à thé.
- *Pityriasis versicolor* est sensible aux HE de Lemon-grass (le plus actif) et de l'arbre à thé (42).

Activité antivirale :

De très nombreuses familles chimiques ont montré des activités antivirales *in vitro*. C'est le cas des phénols monoterpéniques ou aromatiques (difficiles à utiliser, car dermo- et hépatotoxiques), des alcools monoterpéniques ainsi que des aldéhydes monoterpéniques et aromatiques.

L'activité antivirale découle de la liposolubilité des HE, ce qui leur permet de pénétrer dans l'enveloppe virale riche en lipides. Les HE sont plus actives sur les virus enveloppés car ils sont plus fragiles que les virus nus. Ils sont donc particulièrement efficaces envers les virus *herpes simplex*, VHS-1 (herpès labial) et VHS-2 (herpès génital).

Il existe une synergie d'action entre cinéol et monoterpénol, cette association est fréquemment rencontrée dans les HE issues de la famille des Myrtacées (ex. : Arbre à thé, Niaouli et Cajepout). Cette association est très utile dans le traitement des pathologies virales touchant la sphère respiratoire. De même, le couple oxyde de linalol et linalol que l'on retrouve dans l'HE d'Hysope des montagnes présentent une puissante activité antivirale au niveau respiratoire.

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

Les aldéhydes, en usage interne ou en diffusion atmosphériques, sont de bons compléments dans le traitement des infections virales (42).

➤ **Activité antiparasitaire**

Ce sont les phénols qui possèdent l'action la plus puissante contre les parasites, suivis par les alcools monoterpéniques. Certains oxydes comme l'ascaridol sont très spécifiques de la lutte antiparasitaire.

Enfin les cétones ont une activité antiparasitaire bien établie, mais leur utilisation doit se faire avec précautions à cause de leurs neurotoxicité. Cette action est renforcée par l'association cétones/lactones dans l'HE(42).

➤ **Propriétés antioxydantes**

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir(83).

Lorsque l'on cite l'activité antioxydante, on distingue deux sortes de propriétés selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne auto-catalytique de l'oxydation. En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la réduction d'oxygène (117). Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) ou l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (118).

➤ **Activité anti-inflammatoire**

Les HE ont une place particulièrement intéressante dans le traitement de l'inflammation. Elles constituent une alternative aux traitements allopathiques classiques de type AINS (Anti-inflammatoires non stéroïdiens) qui sont connus pour leur effet secondaire digestive au long court. Bien utilisées, ces HE n'induisent pas d'effets nocifs. Seul un risque d'irritation cutanée peut être observé si l'on ne dilue pas suffisamment l'HE dans une HV.

Les molécules concernées sont notamment les aldéhydes monoterpéniques : citrals(néral et gèranial), citronellal, curminal. Les aldéhydes sont utiles par voie externe. Ils interviennent

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

par une action hyperémiante en favorisant les mécanismes physiologiques de défense anti-inflammatoire naturelle impliquant les leucocytes. Cette activité hyperhémiante est concomitante de la levée des spasmes artériolaires favorisant l'état inflammatoire (26). Ils modulent également la réponse immunitaire par voie interne.

Exemple : Étude sur l'HE de Lemongrass (LGEO)(119):

« Pour l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire, le LGEO (10 mg/kg, p.o.) significativement réduit l'œdème de la patte provoqué par les carraghénanes (polysaccharides extraits d'algues rouges) avec un effet similaire à celui observé pour le diclofénac oral (50mg/kg) contrôle. L'administration orale de LGEO a montré une activité anti-inflammatoire dose-dépendante. De plus, l'application topique de LGEO *in vivo* a eu un effet anti-inflammatoire puissant, comme démontré en utilisant le modèle murin de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton. L'application topique de LGEO à des doses de 5 et 10 µL / oreille a significativement réduit l'œdème aigu de l'oreille induit par l'huile de croton chez 62,5 et 75% des souris, respectivement. »

➤ **Activité antalgique et analgésique**

Pour cette activité, on compte de nombreuses molécules, car la variabilité des causes des phénomènes douloureux est également très vaste.

L'eugénol dans l'HE de Girofle est connu pour traiter les algies dentaires. Le problème est que cette HE est assez agressive. Chez les patients allergiques/sensibles à l'eugénol, on préférera utiliser l'HE de Laurier noble qui être moins riche en eugénol, mais qui est composé de phénols-méthyl éthers qui sont de puissants antalgiques.

Dans le domaine des algies céphaliques, c'est le menthol qui a fait ses preuves. Le menthol stimule les récepteurs au froid et est vasoconstricteur. L'utilisation sur les tempes d'HE de Menthe poivrée donne un soulagement rapide de la douleur (migraines, céphalées). Il a également un effet anesthésique local, qui peut être mis à profit lors de traumatismes.

Contrairement à ça, d'autres molécules ont une action par « effet hyperhémiant ». Une vasodilatation périphérique induite par une irritation tissulaire entraîne une sensation de chaleur et une légère anesthésie locale ou un effet antalgique. Les principales molécules concernées sont : le paramycène (Marjolaine des jardins), le camphre (Romarin à camphre), le salicylate de méthyle (Gaulthérie). Ils sont très connus pour la prise en charge des algies tendino-musculaires et ostéo-articulaires (42).

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

➤ **Activité spasmolytique**

De nombreuses HE sont réputées pour diminuer ou supprimer les spasmes gastro-intestinaux. Cette allégation est d'ailleurs établie de façon clinique pour l'HE de Menthepoivrée. Ces HE agissent par différentes actions.

L'action spasmolytique est de type neurotrope et/ou musculotrope. Les molécules lipophiles se fixent sur la membrane des cellules musculaires lisses et entraînent une inhibition de l'entrée du calcium dans les cellules ce qui aboutit à une relaxation des fibres lisses (43). Ces observations ont été faites *in vitro*, et ont démontré une activité spasmolytique marquée sur l'iléon de Cobaye isolé et, dans une moindre mesure sur la trachée de ce même animal (120). Les HE ayant révélé cette activité sont : l'angélique, le basilic, la camomille, le girofle, la lavande fine, la mélisse, la menthe poivrée et le thym.

Elles stimulent les sécrétions gastriques par une action anticholinergique, d'où l'action « digestive » ce qui a pour conséquence des effets positifs sur la nervosité et l'insomnie.

➤ **Activité calmante et relaxante**

Les HE peuvent calmer, détendre ou faciliter le sommeil lors d'une diffusion atmosphérique. Les troubles du système nerveux sont un domaine dans lequel les HE ne sont pas assez exploitées (26).

L'action neuropharmacologique des HE a été étudiée par voie cutanée (121) et atmosphérique (122) sur les désordres psychologiques comme le stress, l'anxiété, la dépression, l'insomnie... montrant une amélioration des symptômes sans effets secondaires.

Les molécules anxiolytiques et favorisant le sommeil (123):

- Les esters : acétate de linalyle, formiate de géranyle, anthranilate de méthyle...
- Les alcools monoterpéniques : linalol, géraniol, alpha-terpinéol...

Les molécules à action plus sédative :

- Les aldéhydes monoterpéniques : citrals (ex. : verveine citronnée, mélisse officinale), curminal (ex. : graines de cumin)
- Les alcools monoterpéniques : linalol (ex. : lavande fine)

Les huiles essentielles de lavande fine et d'hysope officinale inhibent la stimulation induite par la caféine et donc présentent une action sédative qui a été établie sur les souris (124).

III.13. Toxicité des huiles essentielles

Dans le monde actuel des produits naturels, il convient de ne pas utiliser ces substances de façon abusive. Les huiles essentielles doivent être prises à bon escient et à doses adaptées afin d'éviter de dommageables effets secondaires(125)(126), En effet, bien que naturelle, il est capital d'intégrer la notion de la dualité « efficacité-toxicité » parce que toutes substance thérapeutique est potentiellement toxique.

La toxicité des HE est directement liée à leur composition chimique, les composés poly-insaturés étant plus toxiques que les autres (cétones, lactones, phénols...).

➤ Dermo- causticité

Les huiles essentielles riches en phénols, aldéhydes aromatiques et terpéniques sont irritantes pour la peau et les muqueuses à l'état pur. Il faudra toujours les diluer avec une huile végétale (20% d'huile essentielle maximum dans 80% d'huile végétale) et les appliquer sur des surfaces corporelles bien localisées (127).

➤ Photosensibilisation

La photosensibilisation se caractérise par une augmentation de la sensibilité cutanée aux rayonnements solaires, notamment aux rayons ultraviolets, provoquant des réactions érythémateuses susceptibles de favoriser la carcinogenèse.

Toutes les essences des zestes de Citrus (Citron, Orange, Mandarine, Lime, Cédrat, Pamplemousse, Combawa) ainsi qu'Amivisnaga (Khella) et *Angelica archangelica* (Angélique) peuvent présenter un risque de photosensibilisation après application et exposition solaire. Par conséquent, il est recommandé de jamais les utilisées avant une exposition solaire ni dans les 48 heures qui suivent l'application (128).

➤ Risque allergique

Les lactones sesquiterpéniques, l'aldéhyde cinnamique, les phénylpropanoïdes et les peroxydes sont les principales molécules responsables de phénomènes allergiques dont le risque varie évidemment avec le terrain du patient.

L'HE de tea-tree (*Melaleuca alternifolia*), de lavande officinale (*Lavandula angustifolia*) ou encore de laurier noble (*Laurus nobilis*) sont réputées allergisantes. Pour les patients au terrain atopique, il est recommandé de tester l'HE en appliquant quelques gouttes au pli du coude pour observer ou non l'apparition d'une réaction sur la peau. Si tel est le cas, l'utilisation de l'HE sera à proscrire. De plus, quelques HE comme celle de lavande aspic ou

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

de mélisse, utilisées pour combattre les réactions prurigineuses d'origine allergique, peuvent, après un usage trop prolongé, induire des réactions allergiques chez un patient hypersensible(26).

➤ Hépatotoxicité

Les phénols à dose élevée et sur une durée prolongée peuvent altérer les hépatocytes. Le plus toxique étant le carvacrol. Les pyrannocoumarines (*Ammi visnaga*) sont aussi hépatotoxiques. Les doses fortes doivent être utilisées au maximum dix jours. Pour des traitements plus longs, seules des doses faibles sont à envisager. Il faut d'ailleurs associer des huiles essentielles hépatoprotectrices : *Daucus carota* (Carotte cultivée), *Citrus limon* (Citron jaune) et *Menthapiperita* (Menthe poivrée) (62).

➤ Néphrotoxicité

Les HE riches en monoterpènes (surtout pinène et camphène), lorsqu'elles sont utilisées sur le long terme, sont susceptibles d'enflammer et de d'abîmer les néphrons (*e.g.* HE de cyprès ou de genévrier). Elles seront donc contre-indiquées chez l'insuffisant rénal et de façon plus général, chez la personne âgée (129).

➤ Neurotoxicité

Les huiles essentielles d'Absinthe, l'Armoise, le Cèdre, l'Hysope, la Sauge officinale, le Thuya, la Menthe poivrée... sont contre-indiquées en cas d'antécédents d'épilepsie, chez les personnes âgées avec troubles nerveux et chez les enfants de moins de 7 ans. La neurotoxicité s'explique par la forte affinité des cétones pour les lipides, il y aurait passage de la barrière hémato-encéphalique, destruction des gaines de myéline et perturbations électriques des neurones avec excitation puis dépression (26).

➤ Tératogénicité et risque abortif

L'acétate de sabinyle retrouvé dans l'HE de sauge d'Espagne (*Salvia lavandulifolia*) a été identifié comme tératogène *in vivo* chez le Rat (43).

Les HE riches en cétones, et plus particulièrement en thuyone, sont neurotoxiques et abortives. Elles ne doivent pas être administrées chez la femme enceinte ou allaitante ni chez les sujets neurologiquement fragiles (29).

III.14. Critère de qualité

Selon les recommandations françaises (2008), pour garantir leur qualité, les HE devront notamment être obtenues à partir de matières premières identifiées avec précision, contrôlées selon des procédés définis, présentées des caractères physico-chimiques précis, être conservées de façon convenable.

Les caractéristiques physiques, organoleptiques, chimiques et chromatographiques des HE sont définies sur le plan français par des normes établies par l'AFNOR, élaborées par une commission spécifique. Ces normes sont établies en étroite collaboration avec les producteurs ainsi que les importateurs et sont le fruit d'un échange entre experts.

➤ **Dénomination botanique**

L'origine végétale du produit doit être définie avec précision par la dénomination scientifique botanique selon les règles.

➤ **Conditions de production de la plante**

Les matières premières végétales sont obtenues à partir de plantes de collecte ou de plantes cultivées, ces dernières pouvant être issues de semis ou de bouturage.

➤ **Partie de la plante utilisée**

Les HE peuvent être regroupées dans tous les types d'organes végétaux les fleurs, les feuilles, malgré que cela soit moins habituel, dans les écorces, les bois, les racines, les rhizomes, les fruits secs, ou les graines.

➤ **Précision du chimiotype (ou chémotype)**

Pour la même espèce botanique, il peut exister plusieurs races chimiques ou chimiotypes dont leur origine est retrouvée dans de légères différences des voies de biosynthèse, aboutissant à l'accumulation de métabolites secondaires différents.

➤ **Mode d'obtention de l'huile essentielle**

Le choix de la technique dépend principalement de la matière première : son état originel et ses caractéristiques, sa nature proprement dite.

II.15. Les conditions de conservation et de stockage

Afin d'éviter toute dégradation pouvant altérer la qualité et l'efficacité des HE, il convient de respecter quelques règles simples de conservation et de stockage décrites ci-dessous.

Les HE étant de nature instable et sensibles aux phénomènes d'oxydation provoqués par la lumière ou la chaleur, elles doivent être conservées dans un **flacon étanche, coloré** (brun ou bleu), de **faible volume**, dans un **endroit frais** (de température inférieure à 20°C), à **l'abri de**

Chapitre I :Phytothérapie et aromathérapie

l'air et de la lumière. Les flacons en plastiques sont déconseillés de par leur fort potentiel à être attaqués par les constituants des HE.

Afin de limiter au maximum le contact de l'HE avec l'oxygène de l'air, il est également conseillé de bien refermer le flacon d'HE après utilisation. Un flacon d'HE n'ayant jamais été ouvert peut être conservé entre **3 et 5 ans** alors qu'un flacon d'essence du genre *Citrus* ne peut pas l'être plus d'**un an**. Dès lors que le flacon est ouvert, la durée de conservation diminue et varie de **12 à 18 mois** selon l'HE considérée (130)(131).

Chapitre 2 :
Monographies des
Plantes étudiées

Chapitre II : Monographie des plantes étudiées

I.1. Thym: *Thymus ciliatus*

Le thym est le nom général de nombreuses variétés d'herbes de l'espèce *Thymus*, toutes originaires d'Europe et d'Asie.

I.1.1. Nomenclature et taxonomie

Le nom de thym, dans sa forme grecque, a été donné à la plante par les Grecs en tant que dérivé d'un mot qui signifiait «fumiger», soit parce qu'ils l'utilisaient comme encens, soit pour son odeur balsamique.

Tableau II: Classification de l'espèce *Thymus ciliatus* .

Taxonomie	Description
Règne:	Plante
Classe:	Magnoliopsida
Ordre:	Lamiales
Famille:	Lamiaceae
Sous-famille:	Nepetoideae
Genre:	<i>Thymus</i>
Espèce:	<i>Thymus ciliatus</i> . L

I.1.2. Description botanique

Thymus ciliatus est un arbrisseau de petite taille, mais pouvant former des touffes bien étalées sur le sol ; les feuilles florales sont différentes des feuilles caulinaires, en général fortement dilatées à leur portion inférieure. Rencontrée dans les broussailles, matorrals, sur substrats calcaires et siliceux et sur sols rocailleux et bien drainés (132).

La sous-espèce *coloratus* est un sous arbrisseaux très rameaux à capitule dense, gros et à feuilles florales plus ou moins tachées de pourpre au moins à la base. Les fleurs ne dépassent pas 7 à 8mm et sont en général plus pales (133).



Figure 17: *Thymus ciliatus coloratus*.

I.1.3. Répartition géographique

- Dans le monde:

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées(134).il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la Méditerranée. C'est une plante très répandue dans le nord-ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye). Elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud-ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya(135).

Selon une étude menée par Nickavar et al , environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen. C'est pour cela que l'on peut considérer la région méditerranéenne comme étant le centre de ce genre(136).

- En Algérie:

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique. Le *Thymus* de la famille des Lamiacées ou Labiées, comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides (137).

I.1.4. Composition de l'huile essentielle

L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives(138). Les huiles essentielles de thym sont composées par des molécules aromatiques d'origine végétale présentant une très grande diversité de structure.

L'analyse par CG / SM de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation des parties aériennes séchées de *T. ciliatus*, collectées à différents stades de développement de la région d'Annaba a révélé que la composition chimique de cette huile est caractérisée par un pourcentage élevé de thymol (29.52%) de carvacrol (30.58%) représentant les deux composés majoritaires suivie de p-cimène (8.45%) α terpinolène (7.71%) and γ -terpinène (05.58%).(166)

Plusieurs études ont montré que la composition chimique du *Thymus ciliatus* varie d'une région à l'autre, le nord algérien est caractérisé par chémotype thymol alors que l'ouest est caractérisé par un chémotype carvacrol (156)(167)(155).

Une étude réalisée en Algérie et au Maroc a montré que la composition chimique des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* (Desf.) du Maroc est :

Chapitre II : Monographie des plantes étudiées

thymol (44,2 %), de β -E-ocimène (25,8 %) et d' α -terpinène (12,3 %) accompagnés d'autres constituants à des teneurs relativement faibles : linalol (3,24 %), δ -3-carène (3,1 %), 1,8-cinéole (2,63 %) et carvacrol (2,4 %), totalisant 93,67 % (149).

Une autre étude marocaine montre que l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des parties aériennes de *Thymus ciliatus* (Desf.) contient principalement le thymol (44,2%), le β -ocimène (25,8%) et l' α -terpinène (12,3%) (168).

I.1.5. Utilisation traditionnelle

Le thym est la plante médicinale la plus utilisée en médecine traditionnelle algérienne comme expectorant, antitussif, antiseptique, stomachique, antispasmodique, carminatif, anthelminthique et diurétique. Il est aussi utilisé comme condiment : le thym sec, ayant subi un séchage préalable permettant sa conservation, est destiné aux grillades alors que les huiles essentielles, extraites du matériel végétal, servent d'aromatisants.

I.1.6. Activité biologique

L'huile essentielle du thym possède une composante antiseptique et cicatrisante dans les produits destinés aux soins de beauté. Les études ont surtout montré l'activité antioxydante(139)des espèces de genre *Thymus* étudiées. Les activités, antimicrobiennes, spasmolytique et mutagénique vis-à-vis de la bactérie *Salmonella triphymurium* ont été établies.

II.2. Origan: *Origanum Vulgare*

II.2.1. Nomenclature et taxonomie

Le mot *origan* dérive du grec *origanon*, qui se référait simplement à "une plante âcre". L'étymologie du terme grec est souvent donnée comme *oros* pour "montagne" et *ganos* pour "luminosité"(140).

Tableau III: Classification de l'espèce *origanum vulgare* (141).

Taxonomie	Description
Règne:	Plante
Classe:	Magnoliopsida
Sous classe	Astériadae
Ordre:	Lamiales
Famille:	Lamiaceae
Genre:	<i>Origanum</i>
Espèce:	<i>Origanum vulgare</i> L

II.2.2. Description botanique

Origanum vulgare (figure 18) est un sous-arbrisseau vivace de la famille des Lamiaceae, à racines rampantes émettant des tiges pouvant atteindre 50 à 120cm. Les feuilles sont opposées-décussées, courtement pétiolées, et de petite taille, leur limbe est entier ou faiblement denticulé, ovale ou elliptique, glabre ou poilu, ponctué de poils sécréteurs à leur face inférieure ; Les fleurs sont regroupées en inflorescence de type panicule, fixées au sommet des rameaux. Le fruit est un tétrakène lisse, brun, de 1 mm de long, chaque akène qui le compose reste longtemps soudé au fond du calice (142).



Figure 18: *Origanum vulgare* (140).

II.2.3 Répartition géographique

Dans le monde:

Le genre *Origanum* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées (134). Il existe près de 350 espèces d'origan réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée. C'est un genre très répandu dans le nord-ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte (143).

En Algérie:

L'origan comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides. Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leurs variabilités et leur tendance à s'hybrider facilement.(143)

II.2.4. Composition de l'huile essentielle

La sous-espèce Vulgare est celle que l'on utilise majoritairement en tant que condiment et comme espèce médicinale. Cependant, sa teneur en huile essentielle est assez faible.

Plus d'une centaine de composés ont été identifiés dans cette sous-espèce, ce qui représente 92,4% de la composition de son huile essentielle. C'est une huile riche en hydrocarbures monoterpéniques tels que le linalol ou le terpinèn-4-ol et sesquiterpéniques: oxyde de caryophyllène, spathulénol. et des composés phénoliques à de faibles quantités(144)

L'huile essentielle d'Origan contient du carvacrol, qui est considéré comme le composé à valeur sensorielle, ainsi que d'importance antimicrobienne.(144)

Les terpénoïdes, plus d'une cinquantaine ont déjà été isolés de l'espèce *Origanum vulgare*. On peut citer parmi les plus importants: Sabinène, bêta ocimène, garmacrène D et spathulénol(145).

Les huiles essentielles d'*Origanum vulgare* obtenues à partir de 27 échantillons d'Algérie et de Tunisie, extraites par hydrodistillation, possèdent 40 composants qui ont été entièrement identifiés par la chromatographie en phase gazeuse (GPC) et la spectrométrie de masse (CPGSM).

L'analyse montre que toutes les huiles ont été caractérisées par la prédominance de quatre composants dits majeurs, le thymol (7.7 –73.1%), le carvacrol (7.6 –72.6%), le p-cymene (1.7 –25.8 %) et γ - terpinène (1.1 –18.7%) (165).

II.2.5. Usage

L'origan est employé depuis bien longtemps pour ses propriétés antiseptiques, anti-inflammatoires, stimulantes et expectorantes. Il a également un effet bénéfique sur les ballonnements et une action cholérétique. Il peut aussi, en raison de ses vertus antiseptiques, être utilisé en cas d'affection des voies respiratoires, comme la toux, l'angine, la bronchite ou l'asthme. De plus, on essaye parfois de réguler les menstruations ou de soulager les douleurs dentaires et articulaires avec de l'origan (140).

Partie pratique

MATERIEL ET METHODES

I. Introduction

Au cours des dernières décennies, un intérêt croissant est porté sur l'utilisation de produits naturels à base d'huile essentielle dans le domaine médical. De ce fait, la recherche de l'efficacité antibactérienne de ces huiles sur les bactéries fait l'objet aujourd'hui de plus en plus d'études à travers le monde.

L'objectif principal de cette étude est de Déterminer les activités: antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de deux plantes: *Thymus ciliatus* et *Origanum vulgare*

et l'objectif secondaire est de Déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de ces huiles essentielles.

II. Matériels et Méthodes

II.1. Matériel végétal

II.1.1. Origine géographique et période de récolte de la plante

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des parties aériennes de deux plantes *Thymus ciliatus* et *Origanum vulgare*.

L'espèce *Thymus ciliatus* L. a été récoltée durant le mois de mai 2018, de la région de Sebaa Chioukh, située au nord de la wilaya de Tlemcen.

L'espèce *Origanum vulgare* a été récoltée durant le mois de juin 2018, de la région d'Oued Zitoune, située au nord de la wilaya de Tlemcen.

- **Situation géographique**

La wilaya de Tlemcen est située à l'extrême Nord de l'Algérie, bordée au nord par la côte méditerranéenne, au Sud par la wilaya de Naama, à l'Est par les wilayas d'Ain Témouchent et de Sidi bel Abbes et à l'Ouest par les frontières marocaine.

La région de **Sebaa chioukh** est éloignée à peu près de 30 km du chef de la wilaya. Elle se présente sous forme de montagne faisant partie de la chaîne Tellienne inférieure. Son climat est semi-aride tempéré avec une précipitation moyenne de 400mm/an. Le couvert végétal est représenté par des terrains cultivés ou parcours (146).

La région de l'**Oued Zitoun** est un sous bassin de la Tafna (partie septentrionale), il se situe à 20 km au Nord-Ouest de Tlemcen et à 5 km à l'Est de Sabra (Turenne)(147). Le territoire de

Matériel et méthodes

la commune de Sabra est situé au centre de la wilaya de Tlemcen. Son chef-lieu est situé à environ 20 km à vol d'oiseau à l'ouest de Tlemcen. Elle est caractérisée par climat méditerranéen avec été chaud.

Les paramètres géographiques de ces deux régions sont présentés dans le tableau IV

Tableau IV: Paramètres géographiques du thym et de l'origan utilisés.

Espèce	Région	Coordonnées géographiques
<i>Thymus ciliatus</i>	Sebaa Chioukh - Remchi	35° 09' 22" nord, 1° 21' 21" ouest
<i>Origanum vulgare</i>	Oued Zitoune - Sabra	34° 49' 39" nord, 1° 31' 42" ouest

II.1.2. Identification botanique

L'identification botanique a été faite par Pr Bekhechi Chahrazed laboratoire d'écologie et gestion des écosystèmes naturels, université de Tlemcen.

II.1.3. Préparation du matériel végétal

Le matériel végétal n'est généralement pas utilisé immédiatement après la cueillette, il est nécessaire de connaître les meilleures méthodes pour en conserver ses principes actifs et par conséquent ses propriétés thérapeutiques. La conservation des plantes médicinales impose trois étapes : la dessiccation, le conditionnement et le stockage.

Après chaque récolte, le matériel végétal est nettoyé (débarrassé des débris) puis étalé sur du carton étendu par terre ensuite laissé sécher à l'ombre, à l'abri de la poussière et dans des endroits bien aérés, à l'abri de l'humidité et à température ambiante. Le matériel végétal est disposé par fines couches et remué de temps à autre. Le temps de séchage était d'une semaine jusqu'à dix jours.

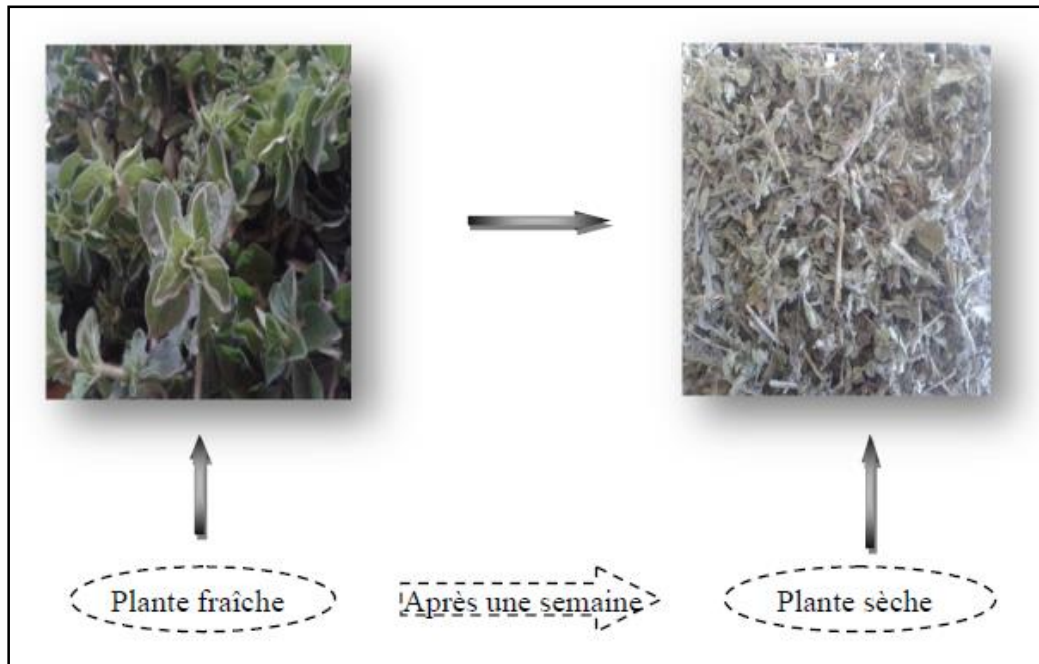


Figure 19: Séchage de l'origan à l'air libre

II.1.4. Extraction d'huile essentielle

Les huiles essentielles sont des substances extrêmement puissantes, pouvant concentrer jusqu'aux 100 fois certains principes actifs de la plante. Il y a plusieurs méthodes d'extractions des HEs citées dans la littérature. L'hydrodistillation représente la méthode usuelle (148).

Dans cette étude les hydrodistillations ont été assurées grâce à un appareil de type Clevenger, on introduit 500g de la matière végétale sèche (la partie aérienne des deux plantes) dans un ballon de 6L contenant 4L d'eau de robinet puis on chauffe l'ensemble pendant une durée de 4h. Ce ballon est relié à un réfrigérant qui sert à condenser la vapeur d'eau contenant l'huile essentielle extraite. L'extraction débute lorsque les premières gouttes tombent dans le collecteur et se poursuit pendant 4 h. Après condensation, l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat. La récupération de cette huile essentielle est effectuée du haut de l'essencier, à l'aide d'une pipette pasteur. Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'être retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant (sulfate de magnésium anhydre). L'huile essentielle ainsi obtenue est mise dans des piluliers en verre ambré et conservée à une température de 4 °C. Le rendement en huile essentielle a été déterminé par rapport à la matière végétale sèche.

Matériel et méthodes

Le rendement en huile essentielle a été calculé en utilisant la relation suivante :

$$R_{HE} = \frac{M_{HE}}{M_{MV}} \times 100$$

R_{HE} : Rendement en huile essentielle (%)

M_{HE} : Masse de l'huile essentielle extraite en (g)

M_{MV} : Masse de matière végétale séchée en (g)

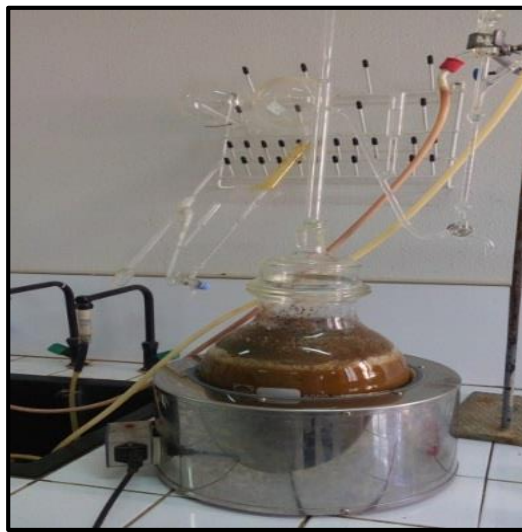


Figure 20: Dispositif d'extraction d'huile essentielle de type Clevenger utilisé pour l'extraction des huiles essentielles

II.2. Activité biologique

II.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Il existe de nos jours un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire(149).

➤ **Méthode de réduction du radical libre DPPH:**

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît

Matériel et méthodes

rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphénylpicryl hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (150).

Elle se fait selon la réaction suivante :

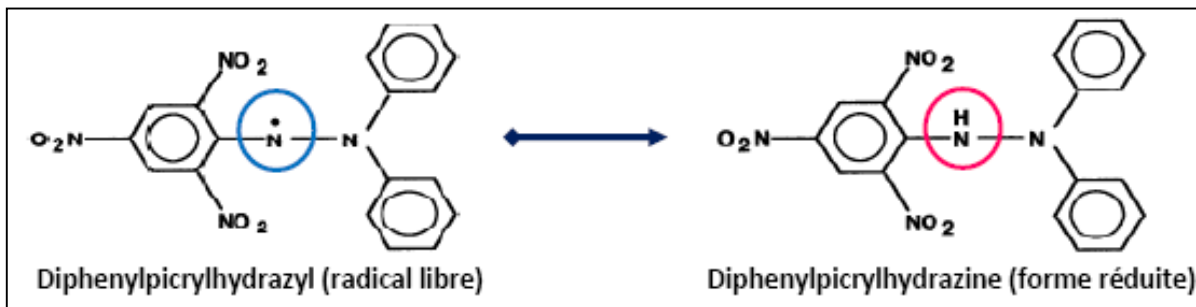


Figure 21: Forme libre et réduite du DPPH (151).

La méthode décrite par Ammar et ces collaborateurs(152) a été employée. Des solutions mères d'échantillon ont été diluées à des concentrations finales de (5 - 0.15625 mg/mL) dans de l'éthanol. 1 mL d'une solution d'éthanol DPPH 0.03 mg/mL a été ajouté à 1 mL de solutions d'échantillon de différentes concentrations, et laissé réagir à température ambiante à l'abri de la lumière. Après 30 minutes, les valeurs d'absorbance ont été mesurées à 517 nm et converties en pourcentage d'activité antioxydante (I%) en utilisant la formule suivante :

$$I\% = \frac{AC - AT}{AC} \times 100 \quad [37].$$

Où :

AC : Absorbance du contrôle ;

AT : Absorbance du test effectué ;

I% : Pourcentage d'inhibition.

L'éthanol pur a été utilisé comme blanc. 1mL d'éthanol a été utilisé avec 1 ml de la solution éthanolique de DPPH comme témoin négatif. Les contrôles positifs étaient effectués en utilisant le BHT. Les valeurs IC_{50} ont été calculées par régression linéaire des parcelles où les abscisses représentaient la concentration des HEs des plantes testées et en ordonnée le pourcentage d'inhibition.

II.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

- **Activité antibactérienne :**

a. Souches utilisées

Les souches bactériennes testées dans cette étude ont été fournies par le laboratoire: Microbiologie Appliquée à l'Agro-Alimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE)(153).

Tableau V: Souches utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne

Bactéries à Gram Positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452
Bactéries à Gram Négatif	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25912
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311

Les activités antibactériennes des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* et *Origanum vulgare* ont été évaluées par deux techniques :

- Technique de diffusion sur gélose (méthode de disques) ;
- Technique de microdilution en utilisant des plaques de 96 puits (Concentration Minimale Inhibitrice ou CMI).

b. Technique de diffusion sur gélose

La méthode de disques permet de déterminer la susceptibilité des bactéries aux agents antibactériens. Cette technique est réalisée selon les recommandations de *Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI [CLSI, 2009].

L'inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h sur milieu gélosé non sélectif. 3 à 5 colonies bien distinctes sont suspendues dans l'eau physiologique 0.85 %, ensuite, la suspension est ajustée au standard 0.5 McFarland avec un spectrophotomètre à 625 nm qui

Matériel et méthodes

correspond à une densité optique de 0.08 – 0.1. Donc, la suspension bactérienne contient approximativement $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/ml.

Des disques en papier filtre Wattman n° 4 de 6 mm de diamètre sont stérilisés par autoclavage, puis imprégnés par 15 μl d'hydrolat (solubilisé dans un mélange d'isopropanol /eau (50/50) et par 15 μl de l'huile (solubilisée dans le tween 80). La Gentamicine a été utilisée comme antibiotique de référence. Le milieu de culture recommandé est la gélose Mueller Hinton à pH 7.2 à 7.4.

L'ensemencement se fait par écouvillonnage de l'inoculum sur la gélose grâce à des stries serrées tout en tournant la boîte à 60° à trois reprises. Ensuite, les disques sont déposés dans les boîtes sur la gélose préalablement ensemencé. Après 15 min de l'application des disques, les boîtes Pétri sont incubées à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 h. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition uniformément circulaire (mm). Ce test a été répété trois fois.

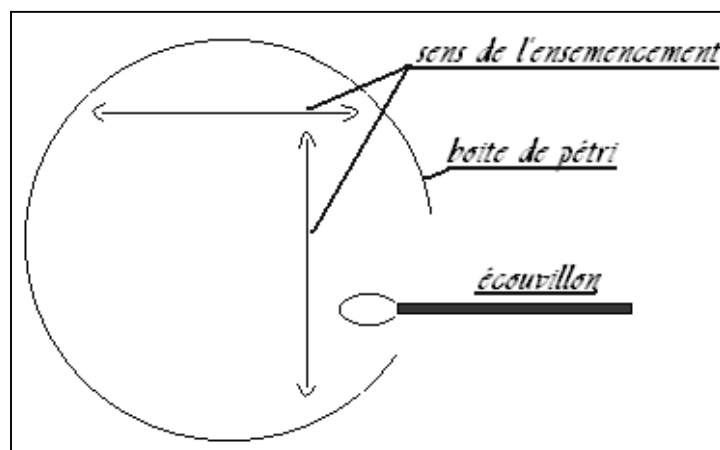


Figure 22: Ensemencement par écouvillon.

c. Méthode de microdilution sur milieu liquide

Dans cette technique, des microplaques à fond rond (96 puits) sont utilisées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice, qui est la plus faible concentration de l'agent antimicrobien qui inhibe la croissance des microorganismes.

Dans chaque puits de la microplaque, est déposé 100 μl du bouillon Mueller Hinton additionné de Tween-80 (concentration finale de 0,001% v/v) qui a été inclus pour faciliter la solubilité des huiles. Ensuite, une série de 10 dilutions de chaque huile a été faite dans la plaque à 96 puits pour obtenir à la fin une série de concentration allant de 25 à 0,01% (v/v) ;

Matériel et méthodes

100 µL de chaque huile a été mélangée avec 100 µL de milieu de culture. Après avoir bien mélangé le contenu du 1^{er} puits, 100 µl est prélevé, puis déposé dans le 2^{ème} puits, et ainsi de suite jusqu'au 10^{ème} puits où 100 µl restantes est éliminée. Par conséquent, nous obtenons une dilution ½ entre chaque puits. Les deux derniers puits représentent des témoins négatifs : le puits n°11 contient le milieu de culture et l'inoculum et le puits n°12 contient uniquement le bouillon Mueller Hinton. Enfin, 100 µl de l'inoculum (5×10^5 UFC/mL) est ajouté dans chaque puits. Les microplaques sont scellées et incubées à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 16 à 20h.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée comme étant la concentration la plus faible pour laquelle aucune croissance ne s'est produite dans le puits [CLSI,2012].

- **Activité antifongique:**

- a.Souches utilisées**

Les souches utilisées sont des levures de *Candida albicans* de référence fournies par le laboratoire Microbiologie Appliquée à l'Agro-Alimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE)

- *Candida albicans* ATCC 26790;
- *Candida albicans* ATCC 10 231 ;
- *Candida albicans* IP444.

L'activité antifongique a été évaluée par deux méthodes :

- Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton supplémentée ;
- Technique de détermination de la concentration minimale inhibitrice.

- b. Technique de diffusion sur gélose**

Dans cette méthode, le milieu de culture utilisé est la gélose Sabouraud à un pH de 7.2 à 7.4, ce qui permet de produire des zones d'inhibition visibles.

L'inoculum est préparé par suspension de 5 colonies distinctes d'une culture jeune de 24 h dans 5 mL d'eau physiologique stérile (0.85%). L'inoculum est ajusté au standard 0.5 McFarland par un spectrophotomètre à 530 nm soit une densité optique de 0.12 à 0.15 pour avoir de 1×10^6 à 5×10^6 cellules/ml. Après 15 minutes de la préparation de la suspension de levures, la surface de la gélose Sabouraud estensemencé par écouvillonnage 3 fois avec une rotation de la boîte de Pétri de 60° pour assurer une bonne distribution de l'inoculum.

Matériel et méthodes

Des disques stériles en papier filtre (6 mm) sont imprégnés par l'huile essentielle à tester (15µl/ disques) et sont déposés sur la gélose.

L'antifongique de référence utilisé est l'amphotéricine B (0.2 mg/ disque). Après 15 min de l'application des disques, les boîtes sont incubées à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 20 à 24 h [CLSI, 2009]. La lecture des résultats se fait par la mesure des zones d'inhibition (mm).

La sensibilité des souches testées envers l'huile essentielle est classée selon les diamètres des halos d'inhibition :

- Diamètre < 8mm: non sensible (-) ou résistante
- Diamètre compris entre 9 à 14 mm: sensible (+)
- Diamètre compris entre 15 à 19 mm: très sensible (++)
- Diamètre > 20 mm: extrêmement sensible (+++)

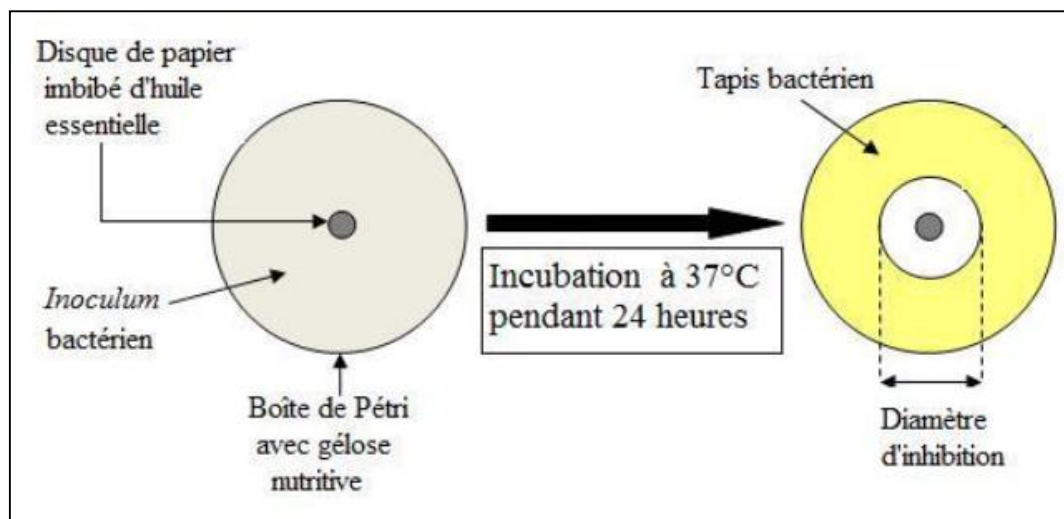


Figure 23: Principe de la méthode de diffusion sur disque.

c. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

C'est une méthode de microdilution sur milieu liquide utilisant des microplaques à fond rond (96 puits) pour déterminer les CMI des agents antifongiques.

100 µL du bouillon Sabouraud est transféré dans chaque puits, ensuite 100 µL de l'huile est déposé dans le premier puits, après avoir bien mélangé le contenu du puits, 100 µL est prélevé pour être ajouté au puits suivant et ainsi de suite jusqu'au 10^{ème} puits. Enfin, 100 µL de l'inoculum ($1 \text{ à } 5 \times 10^4$ cellules/mL) est déposé dans chaque puits. Les deux derniers puits représentent des témoins négatifs : le puits n°11 contient le milieu de culture et l'inoculum et

Matériel et méthodes

le puits n°12 contient uniquement le bouillon Sabouraud. Les microplaques sont ensuite, scellées et placées dans l'étuve à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 h.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée comme étant la concentration la plus faible pour laquelle aucune croissance ne s'est produite dans le puits [CLSI,2012].

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion

III.1. LE RENDEMENT DES HES

Les rendements moyens en huiles essentielles des parties aériennes de *Thymus ciliatus* et *Origanum vulgare* extraites par hydrodistillation, ont été calculés en fonction de la masse du matériel végétal traité. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VI

Tableau VI: rendement des HES

	La masse de la matière sèche	La masse des HES	Le rendement
<i>Thymus ciliatus</i>	450 g	12.6 g	2.80 %
<i>Origanum vulgare</i>	380 g	6.65 g	1.75 %

Nous avons noté que toutes ces espèces végétales révèlent une richesse en huile essentielle obtenue par hydrodistillation.

Le rendement en huile essentielle de *Thymus ciliatus* a fourni un taux de 2.80 %. Cette valeur est proche de celle énoncée par Belhadj(2015)(154), où le rendement était de 3%. Elle est aussi apparentée à celui obtenu par Leila Bousmaha (155)et son équipe ou elle oscille entre 3.0% et 5.1%. Notre rendement peut être considéré comme important par rapport à celui donné par Ghorb et al(156)et Mustapha el Ajjouri (157)qui était de 2.1% et 1.2% respectivement. Amarti et al., (158), ont obtenus un rendement de 1.2% en huile essentielle au Maroc.

Des résultats similaires ont été trouvés par certains auteurs (149)(159) avec l'huile essentielle de *Thymus zygis* avec un rendement allant de 2,3 à 3,6 %. Le rendement en huile essentielle atteint son maximum pendant la phase de floraison (0,9à1,4%)et son minimum pendant la période de dormance (0,15 %) (149).

L'O.vulgare étudié dans ce travail possède un rendement relativement moyen de (1,75%), égal à celui trouvé par Derwich et al.(160) avec l'origan du Maroc. Il est aussi très proche de celui trouvé par Nora Mahfouf en 2018 avec l'origan de la région de Guelma récolté en 2014. Les espèces d'*O.vulgare* de la Tunisie Mechergui et al.(161), ont fourni les plus faibles rendements (0,1-0,7%).Le rendement le plus élevé a été obtenu par Bouhaddouda et al (162) qui a travaillé sur la sous espèce (*O.vulgare glandulosum*) poussant dans la région de Nechmaya (Guelma) avec une valeur de 2,52 (163).

Résultats et discussion

La différence existante entre les rendements d'extraction obtenus est probablement liée aux facteurs suivants :

- Le temps de l'hydrodistillation.
- La durée de séchage.
- Le rapport Eau/Matière végétale.
- La température de chauffage.

Elle peut être liée, également aux facteurs climatiques (chaleur, froid, stress hydrique), facteurs géographiques (altitude, nature du sol, taux d'exposition au soleil) et génétiques (croisements naturels) (163).

Ces rendements peuvent être considéré comme meilleur et ils sont largement supérieurs par rapport à certaines plantes qui sont exploitées industriellement comme source d'huiles essentielles. Ils sont plus élevés que celui de la rose (0,1-0,35 %), la menthe poivrée (0,5-1 %), le néroli (0,5-1 %), l'anise (1-3 %), la lavande (0,8-2,8 %), le romarin (1-2,5 %) et même celui du thym (2-2,75 %) retrouvés dans l'étude réalisé par Edward et son équipe (164).

III.2. Propriétés organoleptiques des HEs

Les propriétés organoleptiques des huiles essentielles des deux plantes sont présentées dans le tableau n VII

Tableau VII: propriétés organoleptiques des HEs.

	Aspect	Couleur	Odeur
H.E de <i>Thymus ciliatus</i>	fluide	Jaune	Forte
H.E de <i>origanum vulgare L.</i>	fluide	Jaune foncé	Forte et fraîche

Résultats et discussion

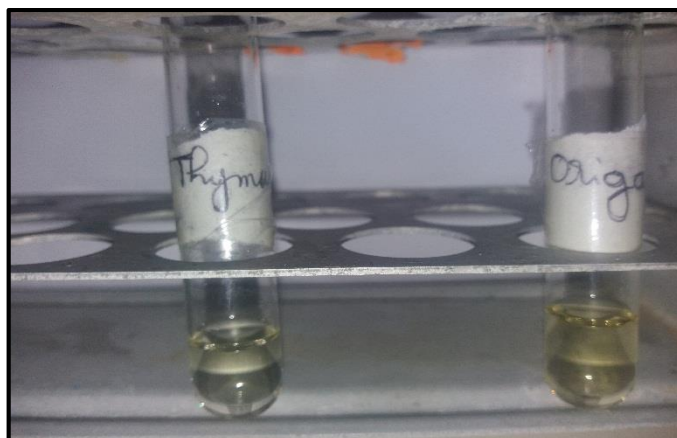


Figure 24:HEs du thym et d'origan.

III.3.Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles par la méthode de réduction du radical libre DPPH

L'activité antioxydante de l'HE de *T.ciliatus* et d'*O.vulgare* évaluée par le test de piégeage du radical DPPH a donné des valeurs qui nous ont permis de tracer des courbes du pourcentage d'activité antiradicalaire pour les H.Es et le BHT. D'après les résultats représentés dans les figures 23 et 24, on peut constater que l'activité antiradicalaire est dose dépendante car elle est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons. La cinétique du pourcentage d'activité antiradicalaire nous a permis de déterminer l'IC50, qui correspond à la concentration d'HE ou du BHT nécessaire à l'inhibition de 50% du DPPH présent dans le milieu. Notons que plus l'IC50 est faible plus l'activité antioxydante du composé est importante. Les résultats sont exprimés sous la forme de valeurs d'IC50.

Tableau VII: % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des H.Es et du BHT à différentes concentrations.

Echantillons	Activité antioxydante						
<i>T. ciliatus</i>	Concentration (mg/mL)	0,15625	0,312	0,625	1,25	2,5	5
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	-	5,86%	15,53%	31,36%		43,82% 80,89%
<i>O. vulgare</i>	Concentration (mg/mL)	0,15625	0,312	0,625	1,25	2,5	5
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	3,69%	13,48%	26,93%	45,30%	65,60%	93,56%

Résultats et discussion

BHT	Concentration (mg/mL)	0,2	0,5	1	2	3	4
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	29,40%	35,60%	48,90%	72,90%	84,10%	87,35%

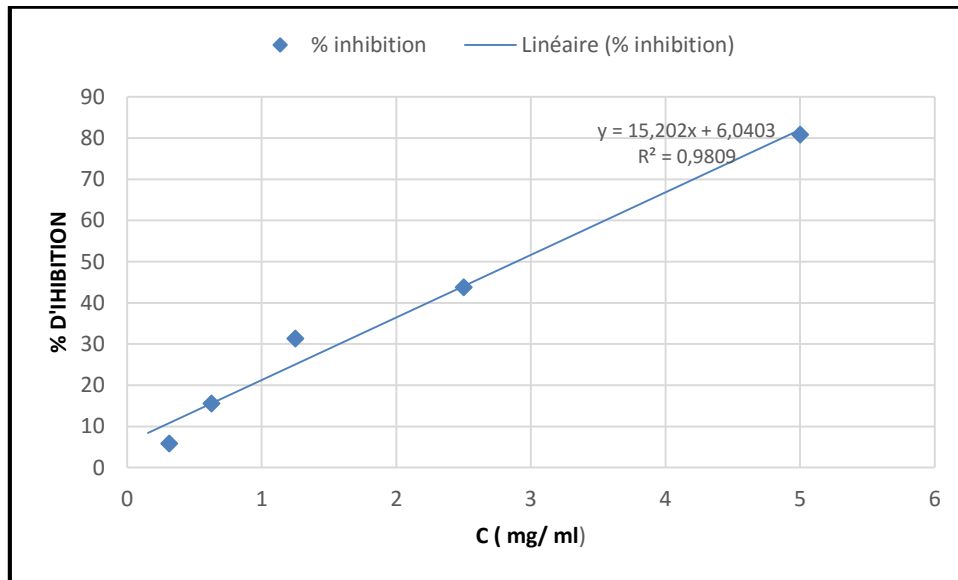


Figure 25: % d'inhibition en fonction de la concentration de l'H.E du thym.

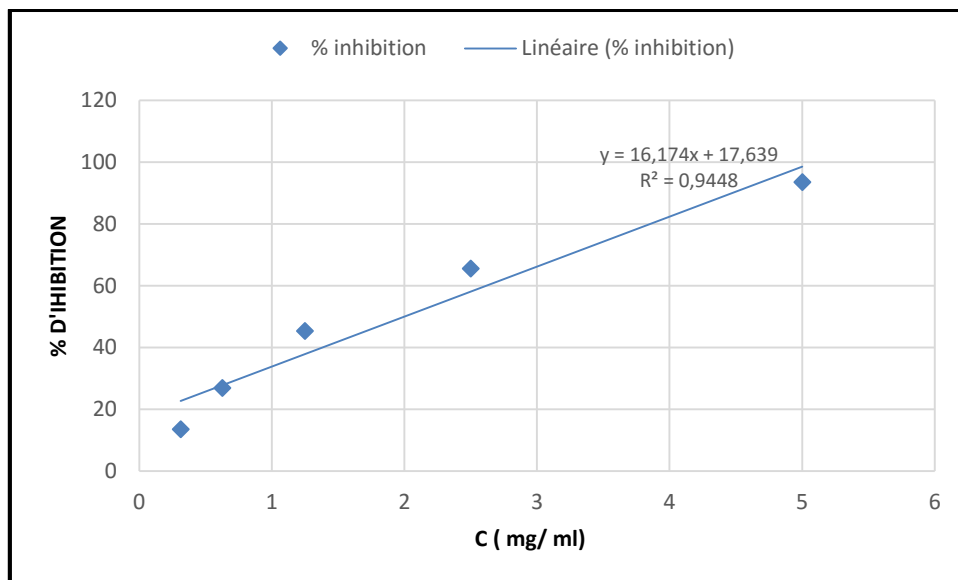


Figure 26: % d'inhibition en fonction de la concentration de l'H.E de l'origan.

Résultats et discussion

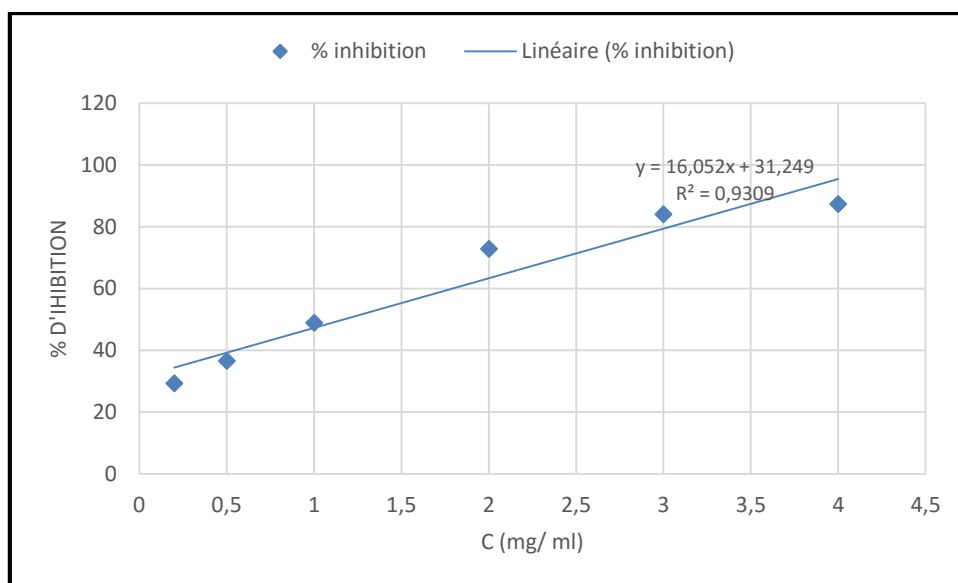


Figure 27:: % d'inhibition en fonction de la concentration du BHT.

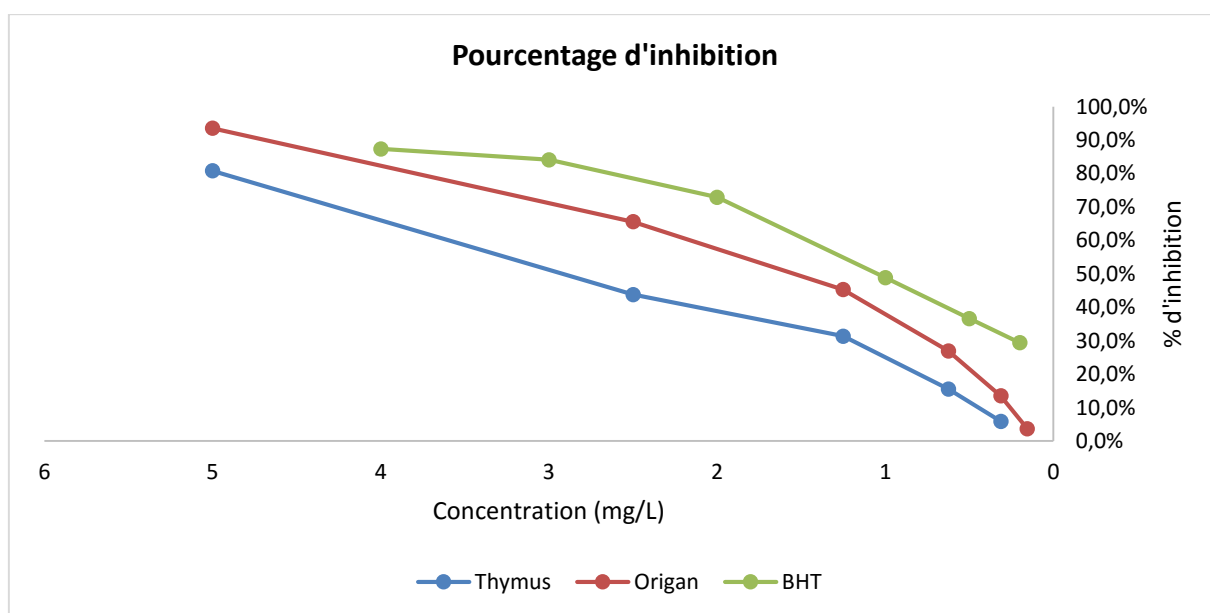


Figure 28: % d'inhibition en fonction de la concentration des HEs et du BHT.

A partir de la figure n :28 on remarque que l'origan présente une meilleure activité anti oxydante que celle du thym a des concentrations identiques avec une $IC_{50}=1.46\text{mg/mg}$ contre 2.89 mg/ml pour le thym cette différence d'activité peut être relative à la concentration en polyphénols de chacune des deux plantes.

Résultats et discussion

Tableau VIII:: L'activité scavenger du radical DPPH par l'HE d'*O.vulgare* l'HE de *Thymus ciliatus* et le BHT

Antioxydant	IC 50 mg/ml
H.E de <i>Thymus ciliatus</i>	2.89
H.E d'<i>Origanumvulgare</i>	1.46
BHT	1.16

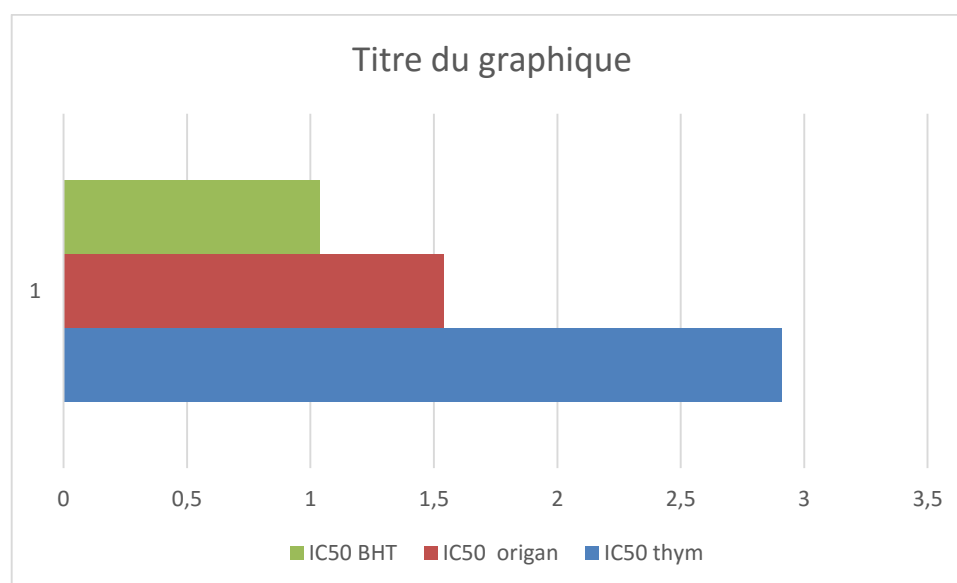


Figure 28: IC50 des HEs étudiées et du BHT.

l'huile essentielle de *Origanum vulgare* a une activité antioxydante mais elle est moins efficace que celle du BHT (IC50 = 1,16 mg/ml) qui considéré comme un antioxydant puissant. Il semble aussi que cette activité est liée à la présence des composés phénoliques dans l'huile essentielle. Le rôle principal des composés comme réducteurs des radicaux libres. Le thymol qui est un composé majoritaire de notre huile essentielle qui possède une forte activité antioxydante (169)(170).

Une étude menée par Sari et al.,(171) sur différentes populations d'origan de différentes zones algériennes (Sétif, Bejaia, Biskra, M'sila et Bordj Bou Arreridj) a révélé la une bonne capacité antiradicalaire des HEs qui ont donné des IC50 variant de 16.2 à 26.7 $\mu\text{g/mL}$. Le travail publié par Mechergui et al. (161) montre que l'HE d'origan de deux régions tunisiennes possède une bonne activité antioxydante avec des IC50 de 105.29 mg/L et 142.86 mg/L. Cependant une autre étude faite aussi sur l'HE de la même espèce poussant en Tunisie a enregistré un IC50 de 625 $\mu\text{g/ml}$ (40). L'HE extraite d'*O.vulgare* L. du Maroc a montré une forte activité antiradicalaire (IC50 60.1 \pm 3.3 mg/L) avec la méthode de DPPH (172). Il est

Résultats et discussion

établi dans plusieurs études que l'activité d'une HE est en rapport avec les composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre les constituants(173)(174); Ainsi les travaux de Tepe et al.(175),ont démontré une grande activité antioxydante des HE contenant des monoterpènes et / ou des sesquiterpènes oxygénés. Miladi et al(176) ont prouvé qu'une corrélation existe entre l'activité antioxydante d'une HE et la teneur en monoterpènes oxygénés ce qui peut expliquer la concordance de nos résultats avec ceux des autres études . En contradiction avec les travaux de Gachkar et al.(177) où ils ont démontré que les huiles avec une prédominance monoterpénique ont une activité assez modeste(163).

En Turquie, les capacités antioxydante ont été analysées à partir de sept essais différents : piégeage des radicaux libres (DPPH et ABTS), réduction de la puissance (FRAP et CUPRAC), acotène / acide linoléique, chélation de métaux et phosphomolybdène donnant les résultats suivants exprimés en trolox équivalents (mg TEs / g d'huile) pour l' *Origanum . vulgare subsp. vulgare* avec 57,23 mg d'ES / g d'huile pour DPPH et 176,41 mg d'ES / g d'huile pour ABTS avec une plus grande activité (p <0,05).

Ces différences dans les capacités de piégeage des radicaux libres peuvent s'expliquer par composantes principales comme le thymol. (178)Mais ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HE qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres, (170)(169).

L'HE du *Thymus ciliatus* a montré un pouvoir de piégeage du radical DPPH faible avec un pourcentage d'inhibition de 50% à une concentration de 2.87mg/ml. Une concentration de 5 mg/mL de l'HE produit un pourcentage d'inhibition de 89%.

Dans une étude menée par H.Belhadj(154) dans la région de Tlemcen sur HE du *Thymus ciliatus* a montré une importante activité avec un IC₅₀= 0.4705 µg /ml, cette discordance entre les résultats peut-être expliquée par une différence du chimotype ou à la période de récolte.

Selon Amarti et al.,(158) qui ont étudié l'activité antioxydante de quatre espèces de thym du Maroc, qui ont enregistré un bon effet antioxydant tel que *T. capitatus*, *T. ciliatus* et H. Belhadj. Activités antioxydantes et hémolytiques des HE de *Thymus ciliatus* et *Ammoides verticillata*. *T.bleicherianus* avec IC₅₀= 0.069mg/mL, 0.074mg/mL et 0.078 mg/mL respectivement, Ces résultats montrent aussi que l'HE de *T.ciliatus* possède une bonne activité antioxydante. L'étude conduite par Jamali et al(179)a révélé une faible efficacité de

Résultats et discussion

l'huile essentielle de *T. ciliatus* (en enregistrant une IC50 de l'ordre de 206.57µg/mL) comparée aux autres variétés étudiées du thym du Maroc et celle du BHT (avec une IC50 de 4.21µg/mL), ce qu'il faut signaler est que la teneur en thymol et carvacrol de cette plante était nettement inférieure par rapport aux autres études citées précédemment ce qui peut justifier nos résultats

Comparée à une étude faite par Bounatirou et al (180) sur les HE de *Thymus capitatus* de Tunisie, les HE de *T. ciliatus* ont donné une activité antioxydante nettement supérieure que celle de *T. capitatus* et qui ont enregistré un taux d'efficacité antioxydante de l'ordre de 82.7% pour une concentration de l'ordre de 0.5mg/mL.

Cette activité peut être attribuée à la présence du thymol et carvacrol car plusieurs auteurs l'ont confirmé (181)(182)(183)(184)(185); , plusieurs d'entre eux ont trouvé une différence dans l'efficacité entre ces deux mono-terpènes phénoliques(181)(186) alors que d'autres non (184). A travers l'étude conduite par Tsai et al. (187), l'HE de *T. vulgaris* a démontré une bonne efficacité à piéger le radical DPPH en enregistrant une IC50 de 0.10µg/mL, ils ajoutent que les composés majoritaires de cette HE étaient le *p*-cymène et le thymol, ce qui a généré cette activité antioxydante car une proportion élevée en thymol et carvacrol fait preuve d'une bonne activité antioxydante.

Jukie et Milos (188), ont montré dans une étude portée sur l'huile essentielle du Thym que les chimiotypes phénoliques (Thymol et carvacrol) et non phénoliques (linalool) sont capables de réduire le radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl(DPPH) mais avec un effet plus élevé enregistré pour les chimiotypes phénoliques .

III.4.Évaluation de l'activité anti microbienne des huiles essentielles

L'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été réalisée par deux techniques complémentaires :

- La première méthode est la diffusion sur gélose (méthode de disques), appelée aussi aromatochrome.
- La deuxième méthode est basée sur la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) sur microplaque.

Le choix des microorganismes dépend du but de la recherche. Dans un screening primaire, les souches de références (ATCC) sensibles aux antibiotiques ou aux antifongiques sont employées. Diverses combinaisons sont envisageables, mais le panneau devrait au moins contenir une bactérie à Gram négatif, une bactérie à Gram positif et une levure(189). C'est

Résultats et discussion

dans ce contexte que le choix des souches pour la réalisation des tests antimicrobiens a été fait de façon à avoir au moins un représentant de chaque classe. Les microorganismes utilisées dans ce travail sont des germes de référence qui ont servi comme modèle dans le criblage l'activité antimicrobienne des mêmes huiles testés dans de nombreuses études(190)(191)(192).

III.4.1.Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles par la méthode de diffusion des disques

Les résultats du screening primaire de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des disques (tableau n°IX) montrent que les deux huiles présentent une forte activité antimicrobienne vis-à-vis de l'ensemble des souches testées. D'une façon générale ; les résultats obtenus lors de cette étude sont très intéressants puisque les diamètres des zones d'inhibitions des deux huiles sont extrêmement élevés comparés avec ceux obtenus avec la Gentamicine ou l'amphotéricine B ; antibiotique et antifongique utilisés comme référence.Sachant pour rappel, qu'une huile essentielle a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm(193). En ce qui concerne l'activité antibactérienne, les meilleurs résultats de l'H.E du thym et de l'origan étaient obtenus vis-à-vis de *S. aureus* et *P. aeruginosa* où les diamètres d'inhibition de 56 mm et 60 mm respectivement (figure n°29).

Résultats et discussion

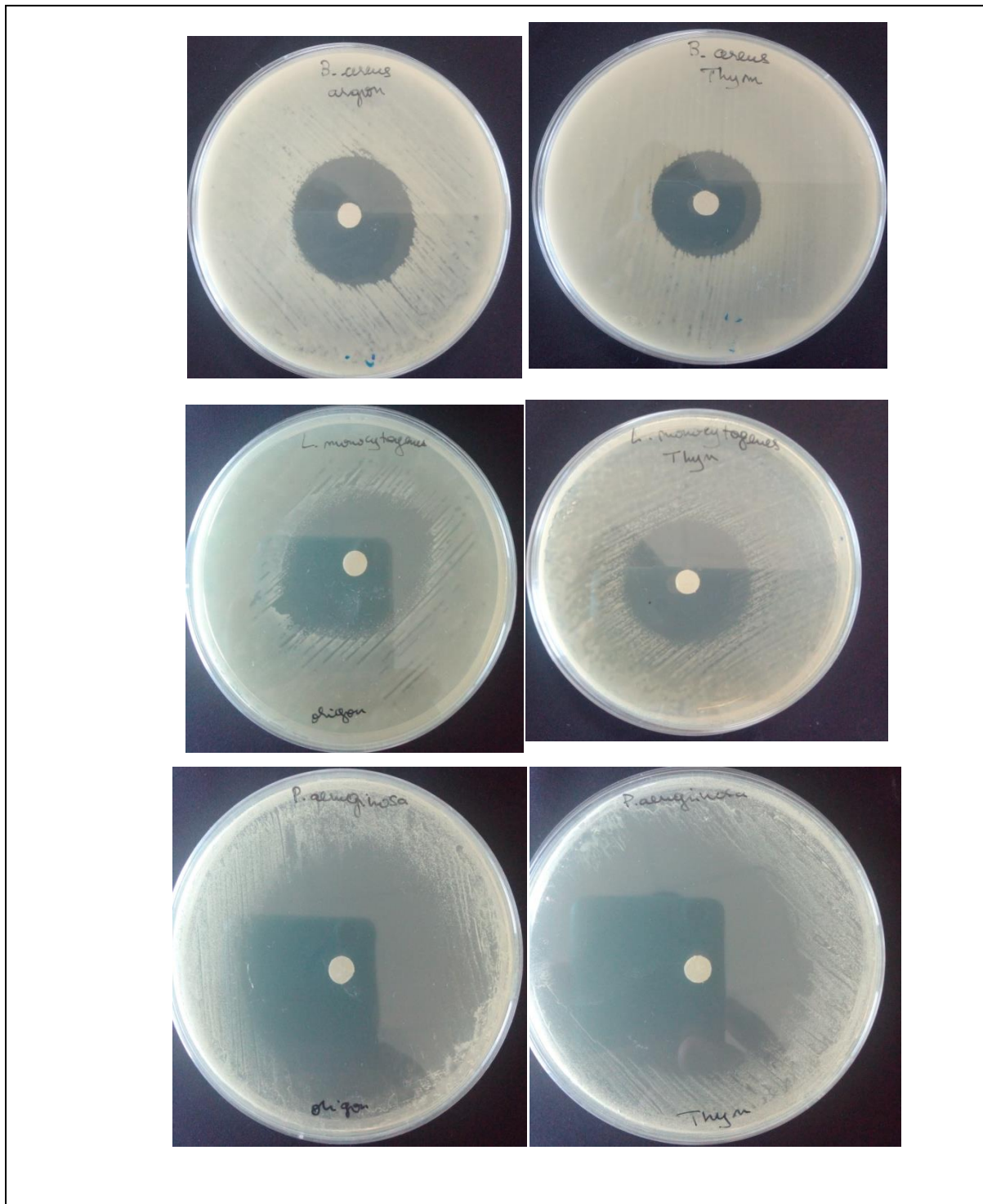


Figure 29:: activité antibactérienne des deux huiles essentielles par la technique des disques à droite : résultats de l'H.E. de l'origan ; à gauche : résultats de l'H.E. du thym

Résultats et discussion

Tableau IX: Résultats de l'activité antimicrobienne des deux H.E testée par la technique de diffusion des disques

	Microorganismes	Les zones d'inhibition (mm)			
		HE du thym	HE d'origan	Gentamycine 15 µg/ disc	Ampho B.
Bactéries Gram positif	Sa	59.5±0.5	60.5±0.5	22	/
	Ml	43±0	33.5±0.5	19	/
	Lm	33±1	36±1	17	/
	EF	35±0	30±0	18,5	/
	Bc	28±0	34±0	20	/
Bactéries Gram négatif	Ec	39±1	35.5±0.5	21,5	/
	Pa	56.5±0.5	51±1	21,33	/
	Stx	20±0	20±0	25	/
Levures	CA 26790	60±1	Totale inhibition	/	30
	CA 10231	Totale inhibition	75.5±0.5	/	32
	CAIP 444	62±0	71±1	/	32

Stx : *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 ; Pa : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; Ec : *Escherchia coli* ATCC 25912 ; Sa : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; Bc : *Bacillus cereus* ATCC 10876 ; EF : *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 ; Lm : *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ; Ml : *Micrococcus luteus* ATCC 9341. CA IP444: *Candida albicans* IP444; CA10231: *Candida albicans* ATCC10231; CA26790: *Candida albicans* ATCC26790.

L'activité antifongique des deux huiles essentielles a été testée vis-à-vis de 3 types de *Candida albicans*. Les résultats mentionnés dans le tableau n° révèlent que ces deux huiles étaient très actives sur les levures utilisées. Les zones d'inhibitions dépassaient les 60 mm et pouvaient atteindre une inhibition totale notamment pour *C. albicans* ATCC 10231 comme le montre la figure n°30.

Résultats et discussion

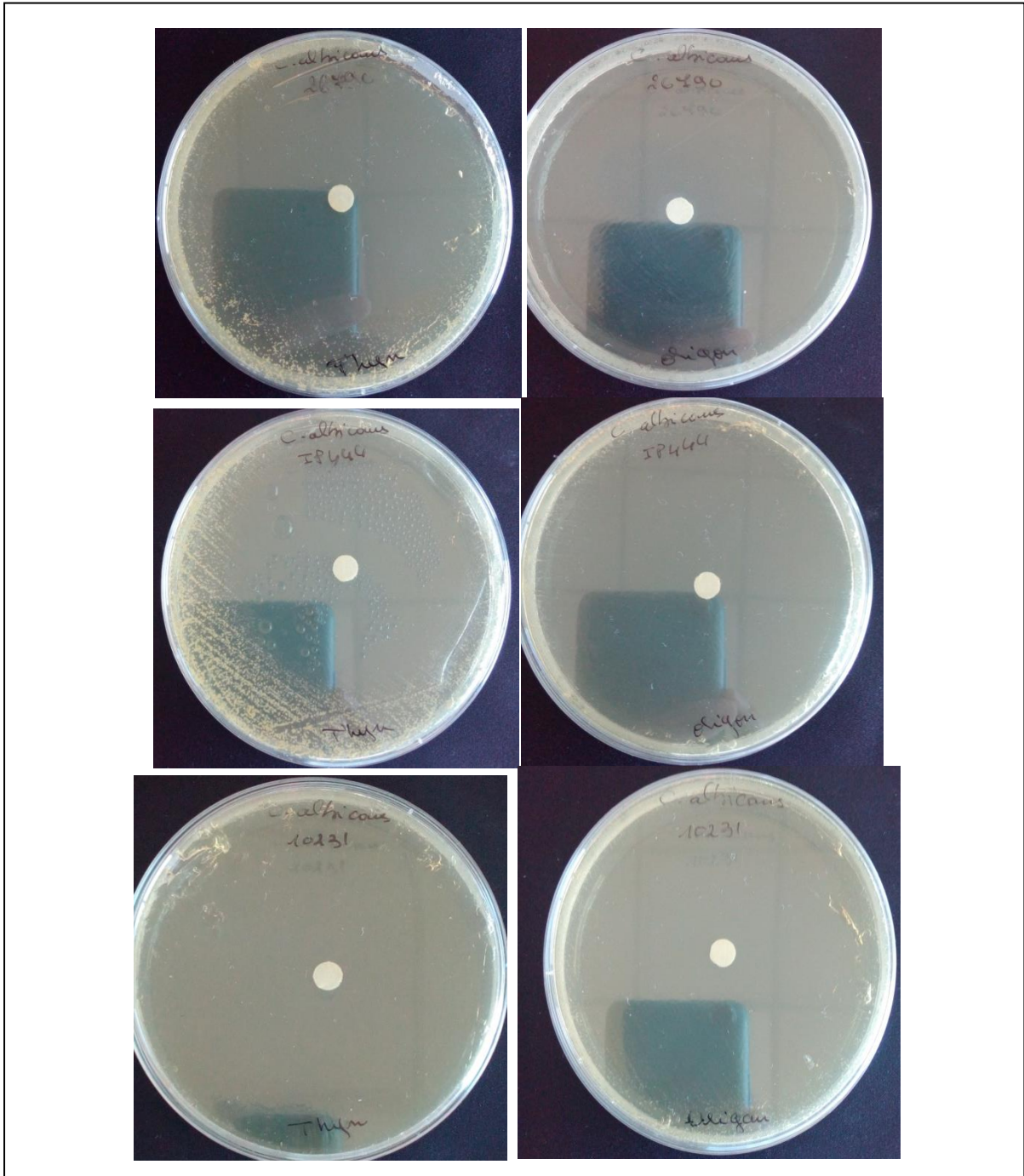


Figure 30: activité anti bactérienne des deux huiles essentielles par la technique des disques : à droite : résultats de l’H.E. du thym; à gauche : résultats de l’H.E. de l’origan

L’activité antibactérienne et antifongique de le H.E des différents genre du Thym a été démontrée par de nombreuses études antérieurs **Rasooli & Mirmostafa, (194)Rotaet al(159)(195)**. En générale, les H.E sont plus actives sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. La structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est

Résultats et discussion

constituée essentiellement de lipopolysaccharides (LPS). Ce constituant évite l'accumulation des huiles sur la membrane cellulaire (196).

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré que les bactéries à Gram négatif étaient aussi sensibles à l'huile essentielle de thym. De ce fait, nos résultats sont en accord avec l'étude de **Imelouane et al**(190). Il est connu que la composition des huiles varie selon la localisation géographique et l'espèce ce qui influence sur l'activité biologique (190).

Une grande partie de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du genre *Thymus* semble être associée à des composés phénoliques (thymol et carvacrol) (197)(159). Selon **Jalsenjak et al** (198), **Sivropoulou et al**(199)et **Sur et al** (200), le camphre et le 1, 8-cinéole sont principalement responsables de l'activité antimicrobienne des huiles végétales, qui en contiennent.

En ce qui concerne l'activité antimicrobienne de le H.E de l'origan, toutes les souches tests ont été sensibles. Selon les résultats de l'analyse de la chromatographie en phase gazeuse faite par **Barros et al** (201), les principaux constituants dans le H.E de l'origan sont le carvacrol, le terpinène-4-ol et le thymol. Leur mécanisme d'action vis-à-vis des microorganismes n'est pas complètement élucidé, mais les chercheurs spéculent que ces composés entraînent une perturbation de la membrane vis les composés lipophiles (192)(202).

Ce mélange complexe de ces nombreuses molécules présentes dans les huiles essentielles nous incite à se poser deux questions : l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est due seulement au principaux constituants et dans ce cadre-là quel est le rôle des constituants qui se trouvent en petite concentration ? ou bien l'activité antimicrobienne est due à l'effet synergique des différents constituants ?

Ainsi pour répondre à ces questions, plusieurs investigations doivent être réalisées et l'activité antimicrobienne doit être faite par une technique plus précise que celle de la diffusion qui est considérée comme un screening primaire.

III.4.2.Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles par la méthode des plaques de microtitration.

Les résultats du screening primaire des deux huiles étudiées par le procédé de diffusion sur disque ont mis en évidence une excellente activité antimicrobienne. A la lumière des résultats préliminaires, nous avons choisi une évaluation plus détaillée par la méthode de dilution en utilisant la plaque de microtitration (96 puit). Les résultats sont exprimés dans le tableau n IX.

Résultats et discussion

Tableau X: Résultats des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des deux H.E.

	Microorganismes	CMI			
		HE du thym % (v/v)	HE d'origan % (v/v)	Gentamycine (µg/ ml)	Ampho B. (µg/ ml)
Bactéries Gram positif	Sa	0.048±0.00	0.048±0.00	0.5	/
	Ml	0.048±0.00	0.048±0.00	/	/
	Lm	0.048±0.00	0.048±0.00	8	/
	EF	0.048±0.00	0.048±0.00	16	/
	Bc	0.048±0.00	0.048±0.00	0.5	/
Bactéries Gram négatif	Ec	0.048±0.00	0.048±0.00	0.5	/
	Pa	0.048±0.00	0.048±0.00	0.5	/
	Stx	0.048±0.00	0.048±0.00	0.25	/
Levures	CA 26790	0.048±0.00	0.048±0.00	/	4
	CA 10231	0.048±0.00	0.048±0.00	/	8
	CAIP 444	0.048±0.00	1.562±0.00	/	4

Stx : *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 ; Pa : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; Ec : *Escherchia coli* ATCC 25912 ; Sa : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; Bc : *Bacillus cereus* ATCC 10876 ; EF : *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 ; Lm : *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ; Ml : *Micrococcus luteus* ATCC 9341. CA IP444: *Candida albicans* IP444; CA10231: *Candida albicans* ATCC10231; CA26790: *Candida albicans* ATCC 26790.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que toutes les bactéries testées ont exactement de la même CMI vis-à-vis des deux huiles étudiées sauf pour *Candida albicans* IP444 où les CMI étaient de 0.048% pour l'H.E. du Thym et de 1.562% pour l'H.E. de l'origan. On remarque également, que l'appartenance des souches bactériennes à Gram positif ou à Gram négatif n'influe pas sur leur sensibilité, de ce fait, la susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram, chose qui a été rapportée par les travaux d'**Ouattara et al**(203) et de **De Dorman et Deans**,(204).

Nos résultats sont en accord avec ceux des études antérieures, où l'H.E du Thym et de l'origan avaient des effets bactéricides intéressantes avec faibles valeurs des CMI notamment vis-à-vis d' *E. coli*(115), lyse cellulaire vis-à-vis des bactéries du genre *Bacillus* (205) et un effet anti-candida induite de façon expérimentale chez des rats immuno-déprimés(206). L'importante bio-activité de l'HE d'origan est en relation avec sa teneur élevée en carvacrol et thymol (207).

Résultats et discussion

D'une manière générale, l'activité antimicrobienne des substances naturelles s'explique par la lyse de la membrane. Les huiles essentielles, flavonoïdes, alcaloïdes voire même les tanins pourraient induire une fuite d'ions de potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquences des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort contournables pour les traitements thérapeutiques des infections bactériennes humaines et animales(207).

A la lumière des résultats obtenus lors de ce présent travail et en se basant sur la littérature, on peut confirmer un important effet inhibiteur des deux huiles essentielles *Thymus ciliatus* et *Origanum vulgare*. De ce fait le recours à l'utilisation de ces deux huiles constitue une alternative dans le domaine d'infectiologie pour le traitement des infections humaines d'origine bactérienne et/ou fongique mais aussi dans les industries agro-alimentaires comme additifs alimentaires. D'autant plus que leur utilisation en très faible quantité leur confère un avantage particulièrement intéressant.

**CONCLUSION
GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Conclusion

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires. Selon l'OMS, plus de 80% de la population mondiale dépendent encore de la médecine traditionnelle pour prendre soin de leur santé. Un grand nombre de plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés biologiques différentes. Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur les huiles essentielles extraites de ces plantes aromatiques.

Les huiles essentielles ont toujours été employées par les civilisations du monde entier pour leurs traditionnelles vertus thérapeutiques. Leur efficacité n'est plus à prouver et de nombreuses publications ont étayé scientifiquement leurs différentes propriétés. Ce sont des substances aromatiques d'une composition chimique complexe ce qui leur confère des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes très intéressantes à mettre à profit dans la préservation des produits alimentaires

En Algérie, nombreuses sont les plantes décrites pour leurs vertus médicinales, c'est en cela que nous nous sommes intéressés à étudier les activités antioxydantes et antimicrobiennes des huiles essentielles de deux plantes aromatiques qui sont très utilisés par la population locale pour se remédier de plusieurs maladies, mais aussi pour aromatiser des plats délicieux caractéristique de la région de Tlemcen.

Thymus ciliatus. et *Origanum vulgare* récoltées toutes les deux dans la région de Tlemcen et en ont fait l'objet d'une extraction de leurs huiles essentielles et une évaluation de leur potentiel antioxydant, antibactérien et antifongique. L'obtention des huiles essentielles de la partie aérienne des deux plantes a été accomplie par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. La détermination du rendement en huile essentielle a montré une rentabilité 2.8% pour le thym et 1.75% pour l'origan.

L'activité antioxydante des essences étudiées par la méthode de piégeage des radicaux libres DPPH a montré que l'HE d'origan possède une bonne activité antioxydante plus importante que celle du Thym avec un IC50 de 1.54mg/ml et 2.91mg/ml respectivement et proche a celle du BHT qui est de 1.05 mg/ml .

Conclusion

En outre, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des deux plantes ont été testées individuellement sur une multitude de microorganismes de référence (8 bactéries et 3 levures). L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sont très actives sur les différents germes qui peuvent causées des infections communales ou nosocomiales. Ces substances sont très actives sur la quasi-totalité des bactéries testées. Leur importante action sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ainsi que les trois souches de levures ouvre la perspective d'usage de ce type de molécules pour la prévention et la lutte contre l'apparition, la transmission et la dissémination de bactéries résistantes, mais aussi pour la bio-décontamination du matériel médical.

Nous pouvons conclure de cette étude que les huiles essentielles peuvent être considérées comme une alternative des préservatifs chimiques et des agents conservateurs très prometteurs dans l'industrie alimentaire. Ces sources potentielles d'antioxydants naturels peuvent être aussi exploitées dans des préparations pharmaceutiques et cosmétiques.

Nos résultats préliminaires montrent que les huiles essentielles obtenues témoignent d'activités antimicrobiennes et antioxydantes in vitro. D'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- La détermination de la composition chimique des HE par GC-MS afin d'établir la relation structure activité.
- L'étude de l'activité antioxydante par d'autres méthodes (FRAP, test de blanchissement de la β -carotène.)
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'association de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* et *Origanum vulgare* par le checkerboard test.
- Partant du fait qu'une substance pouvant être très active in vitro, peut perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps ; Une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue globale sur l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits testés.
- Evaluation d'autres effets biologiques in vitro comme in vivo des HE .

Annexe

Annexe

Annexe n° 1: Préparation de quelques milieux de culture (Formule en g/L).

Milieux gélosés

Gélose Mueller-Hinton :

- Infusion de viande de bœuf300
- Hydrolysate de caséine.....17,5
- Amidon.....1,5
- Gélose17
- Eau distillée1

pH =7,4

Gélose nutritive :

- Peptone15
- Extrait de viande.....10
- Extrait de levure.....2
- Chlorure de sodium.....5
- Agar.....20
- Eau distillée1

pH =6,8-7,4

Gélose Sabouraud :

- **Glucose**.....
40
- **Peptone**.....
10
- **Agar**.....
15
- **Eau distillée**
1

pH = 5,8

Milieux liquides

Bouillon nutritif :

Annexe

- Peptone10
- Extrait de levure 5
- Chlorure de sodium 5
- Eau distillée1000

pH = 7,2

Bouillon Mueller Hinton :

- Hydrolysats de caéine.....17,5
- Infusion de viande de bœuf.....2
- Amidon.....1,5
- Eau Distillée.....1

pH= 7,4

Bouillon Sabouraud :

- **Glucose**.....
40
- **Peptone**.....
10
- **Eau distillée**
1

pH = 5,8

Solutions

Eau physiologique :

- Eau distillée 1000
- Chlorure de sodium (NaCl)..... 9

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Valorisation-d-une-plante medicinale-a-activite.pdf [Internet]. [cité 1 juin 2019]. Disponible sur: <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/2037/1/Valorisation-d-une-plante%20medicinale-a-activite.pdf>
2. Clément R-P. Aux racines de la phytothérapie: entre tradition et modernité (1re partie). *Phytotherapie*. 1 août 2005;3(4):171- 5.
3. Les phytomédicaments ayurvédiques [Internet]. [cité 2 juin 2019]. Disponible sur: http://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:CN8PKMRT40gJ:scholar.google.com/+Les+phytom%C3%A9dicaments+%C3%A2yurv%C3%A9diques.&hl=fr&as_sdt=0,5
4. Kramer SN. *L'Histoire commence à Sumer*, preface by Jean Bottéro. Paris Flammarion Col Champs. 1994;
5. El Ouali I, Hammouti B, Aouniti A, Ramli Y, Azougagh M, Essassi EM, et al. Thermodynamic characterisation of steel corrosion in HCl in the presence of 2-phenylthieno (3, 2-b) quinoxaline. *J Mater Environ Sci*. 2010;1(1):1–8.
6. Bernadet M. *“Phytoaromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles*. Ed Dangles. 2000;
7. Kar A. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. New Age International; 2003.
8. Merah S, Larabi L, Benali O, Harek Y. Green corrosion inhibitor: inhibitive action of aqueous extract of *Anacyclus pyrethrum* L. for the corrosion of mild steel in 0.5 MH₂so₄. *Pigm Resin Technol*. 2008;37(5):291- 8.
9. ATTOU Amina. Détermination de la Composition Chimique des Huiles Essentielles de Quatre Plantes Aromatiques de l'Ouest Algérien (Région d'Ain Témouchent).
10. La phytothérapie clinique dans les affections dermatolo... - Google Scholar [Internet]. [cité 8 juin 2019]. Disponible sur: https://scholar.google.fr/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&q=+La+phytho%C3%A9rapie+clinique+dans+les+affections+dermatologiques+Universit%C3%A9+Mohamed+V-Rabat&btnG=
11. Bouzabata A. Les médicaments à base de plantes en Algérie: réglementation et enregistrement. *Phytothérapie*. 2017;15(6):401–408.
12. LUU, D.V., Université des Sciences et techniques de Montpellier. 2007.
13. Lapraz J-C, Hedayat KM, Pauly P. Endobiogeny: a global approach to systems biology (Part 2 of 2). *Glob Adv Health Med*. 2013;2(2):32–44.
14. Chabrier J-Y. *Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie* [PhD Thesis]. UHP-Université Henri Poincaré; 2010.
15. *Phytothérapie clinique individualisée: pour une médecine des substances végétales*. <http://www.iesv.org/phytotherapie.ph>.

Références bibliographiques

16. MOHAMMEDI Z. Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie [PhD Thesis]. 2013.
17. Boughendjioua H. Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. *Compos Chim Act Antioxyd Antimicrob Huiles Essent Citrus Limon Cinnamomum Zeylanicum Thymus Numidicus Dr En Sci Spéc Biol Végétale Univ Badji Moktar Annaba*. 2014;117:125–130.
18. Lardry J.M., Haberkorn V., 2003, Les formes galéniques destinées à l'usage externe. *Kinésithérapie, Les Annales*, n° 16, .
19. Deschamp S., 1990, 60 huiles essentielles de plantes. Paris, Éditions Arys.
20. Kramer SN. L'Histoire commence à Sumer, preface by Jean Bottéro. Paris Flammarion Col Champs. 1994;
21. Franchomme P., Penoël D. et Jollois R., 1990, L'aromathérapie exactement – Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique d.
22. Abrassart J.L., 1997, Aromathérapie essentielle : huiles essentielles : parfums pour le corps et l'âme. Éditions Guy Tré.
23. Roulier G., 1990, Les huiles essentielles pour votre santé : traité pratique d'aromathérapie. Propriétés et indications .
24. Kerbouche L, Hazzit M, Baaliouamer A. Essential oil of *Satureja calamintha* subsp. *nepeata* (L.) Briq. from Algeria: Analysis, antimicrobial and antioxidant activities. *J Biol Act Prod Nat*. 2013;3(4):266–272.
25. FAUCON M. Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements et aide à la prescription. Paris : Sang de la Ter.
26. FRANCHOMME P, JOLLOIS R, PENOEL D. L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des extraits.
27. Belaiche P., 1979, Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie, Tome 1 : L'aromatogramme ; Ed: Paris, Maloine.
28. ATTOU Amina. Détermination de la Composition Chimique des Huiles Essentielles de Quatre Plantes Aromatiques de l'Ouest Algérien (Région d'Ain Témouchent).
29. BAUDOUX D. L'aromathérapie : Se soigner par les huiles essentielles. 1e éd. Biarritz : Atlantica, 2000. 223 p.
30. PACCHIONI I. Aromatherapia : Tout sur les huiles essentielles. Paris : Aroma Thera, 2014. 351 p.
31. Pitman V., 2004, Aromatherapy: A Pratical Approach; Ed: Nelson Thornes, 137 pages.
32. Zhiri A., 2006, Aromathérapie ; Nutranews ; Ed: Fondation Libre Choix ; p: 2-16.

Références bibliographiques

33. Baser K.H.C., Buchbauer G., Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications, Ed. Taylor and Francis Gro.
34. Festy D., 100 Réflexes AROMATHERAPIE : Je me soigne avec les huiles essentielles, Pratiques Efficaces et Faciles, Ed Ledu.
35. J. Crosthwaite, B. Malcolm, An economic analysis of native pasture in the hills and tablelands of south-eastern Australia.
36. CF. Carson, TV. Riley, Letters in Applied Microbiology. 16(1993) 49.
37. W. Boyle, American Perfumer and Essential Oil Rev. 66(1955).
38. Gattefossé RM, de Courmelles F-VF. Aromathérapie, les huiles essentielles, hormones végétales. Préface du Docteur Foveau de Courmelles,... Girardot; 1937.
39. Besombes C. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. UFR Sci Univ Rochelle. 2008;
40. Selles C. Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen: *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5 M [PhD Thesis]. 2012.
41. J. Bruneton, Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – Techniques et documentations, 3^{ème} Edition, Lavoisier (1.
42. Laurent J. Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine [PhD Thesis]. 2017.
43. BRUNETON J. Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales - (5^o Edition). Lavoisier; 2016.
44. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles -ANSM- [Internet]. Disponible sur: <http://ansm.s>.
45. Chassaing V. L' Aromathérapie: les huiles essentielles au service du cheval. Violaine Chass. 2006;4–8.
46. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod.* 1997;60(1):52–60.
47. Nakatsu T, Lupo Jr AT, Chinn Jr JW, Kang RK. Biological activity of essential oils and their constituents. In: *Studies in natural products chemistry.* Elsevier; 2000. p. 571–631.
48. Hussain AI, Anwar F, Sherazi STH, Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem.* 2008;108(3):986–995.
49. Teixeira B, Marques A, Ramos C, Neng NR, Nogueira JM, Saraiva JA, et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind Crops Prod.* 2013;43:587–595.

Références bibliographiques

50. Bedi, S., Tanuja, Vyas, S.P., 2010. A Handbook of Aromatic and Essential Oil Plants: Cultivation, Chemistry, Processing and Use.
51. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):446–475.
52. Brester, G., Swanser, K., Watts, T., 2002. Market Opportunities and Strategic Directions for Specialty Herbs and Essential Oil.
53. Hammer, K.A., Carson, C.F., 2011. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: Thormar, .
54. Huiles essentielles : un marché mondial en croissance [Internet]. Jardins de France. [cité 15 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.jardinsdefrance.org/huiles-essentielles-un-marche-mondial-en-croissance/>
55. Sallé, J. L. « Les huiles essentielles; Synthèse d’aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie », Edition Friso.
56. Teissedre PL, Waterhouse AL. Inhibition of Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins by Phenolic Substances in Different Essential Oils Varieties. *J Agric Food Chem.* 1 sept 2000;48(9):3801-5.
57. Seu-Saberno, M.; Blakeway, J. « La mousse de chêne, une base de la parfumerie », Pour la science, Edition Française de Sci.
58. Pharmacopée Européenne, 3ième Ed. 1999, .
59. Huiles essentielles et médecine, huiles essentielles et phytothérapie [Internet]. [cité 15 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.phytomania.com/huiles.essentielles.htm>
60. COUIC-MARINIER F. Huiles essentielles : l’essentiel - Conseils pratiques en aromathérapie pour toute la famille au quotid.
61. Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). *Biochem Mol Biol Plants.* 2000;24:1250–1319.
62. BAUDOUX D, BLANCHARD JM, MALOTAUX AF. Les cahiers pratiques d’aromathérapie selon l’école française : Soins palliatifs. .
63. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. troisième édition. 1999.
64. Velé H. Valorisation officinale des huiles essentielles autorisées dans les phytomédicaments. 2015.
65. Beylemans A. L’aromathérapie dans le monde de l’officine: rôle du pharmacien [PhD Thesis]. 2013.
66. Flemming M, Kraus B, Rasclé A, Jürgenliemk G, Fuchs S, Fürst R, et al. Revisited anti-inflammatory activity of matricine in vitro: Comparison with chamazulene. *Fitoterapia.* 2015;106:122–128.

Références bibliographiques

67. Morin P, Gunther C, Peyron L, Richard H. Etude des phénomènes physico-chimiques intervenant lors du procédé d'hydrodistillation. Bull Société Chim Fr. 1985;(5):921–930.
68. Joy Bowes E., The chemistry of Aromatherapeutic Oils, 3rd Edition, 2003, p. 56.
69. Roulier G., Les huiles essentielles pour votre santé, Ed. Dangles, 2000, p.336.
70. Maffei & Sacco, 1997, Perfumer and flavorist, Flavour and Fragrance Journal.13, p.61.
71. 3 Caractéristiques physiques et chimiques des huiles essentielles - Les huiles essentielles [Internet]. 2012 [cité 21 juin 2019]. Disponible sur: <http://tpejbs2012.canalblog.com/archives/2012/02/13/23515518.html>
72. Garnerio J. Problemes rencontres au cours de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles. 2. Parfums Cosmet Aromes. 1977;
73. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends Food Sci Technol. 1 juin 2006;17(6):300-12.
74. Starmans DA, Nijhuis HH. Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. Trends Food Sci Technol. 1996;7(6):191–197.
75. Fasty D., 2007. Ma bible des huiles essentielles. Leduc Editions. P :20.
76. Masango P. Cleaner production of essential oils by steam distillation. J Clean Prod. 2005;13(8):833–839.
77. El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EA, Casabianca H, et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. Int J Pharm. 2015;483(1-2):220–243.
78. Shellie R, Marriott P, Chaintreau A. Quantitation of suspected allergens in fragrances (Part I): evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography for quality control. Flavour Fragr J. 2004;19(2):91–98.
79. Wan PJ, Pakarinen DR, Hron Sr RJ, Richard OL, Conkerton EJ. Alternative hydrocarbon solvents for cottonseed extraction. J Am Oil Chem Soc. 1995;72(6):653–659.
80. Ferhat MA, Meklati BY, Chemat F. Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. Flavour Fragr J. 2007;22(6):494–504.
81. Möller K., 2008. La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Editorial UNICO. P :152.
82. PELLERIN P. Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. In: Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique. Société des experts-chimistes de France; 2001. p. 51–62.
83. Richard F. Manuel des corps gras. Paris Ed Lavoisier Tec Doc. 1992;1228–1242.

Références bibliographiques

84. Guan W, Li S, Yan R, Tang S, Quan C. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chem.* 2007;101(4):1558–1564.
85. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem.* 1 juill 2001;8(3):303-13.
86. Assami K, Pingret D, Chemat S, Meklati BY, Chemat F. Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. *Chem Eng Process Process Intensif.* 1 déc 2012;62:99-105.
87. Chemat F, Lucchesi ME, Smadja J, Favretto L, Colnaghi G, Visinoni F. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal Chim Acta.* 5 janv 2006;555(1):157-60.
88. Extraction of essential oils with carbon dioxide - Moyler - 1993 - *Flavour and Fragrance Journal* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 7 févr 2019]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ffj.2730080502>
89. Chen CC, Kuo MC, Wu CM, Ho CT. Pungent compounds of ginger (*Zingiber officinale* roscoe) extracted by liquid carbon dioxide. *J Agric Food Chem.* 1 mai 1986;34(3):477-80.
90. Chemat F, Lucchesi M, Smadia J. Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances. 2004.
91. Lucchesi ME, Chemat F, Smadja J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J Chromatogr A.* 23 juill 2004;1043(2):323-7.
92. Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoucef M, Desjobert J-M, Bernardini A-F, et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* 1 janv 2008;106(1):132-9.
93. Lucchesi ME, Smadja J, Bradshaw S, Louw W, Chemat F. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J Food Eng.* 1 avr 2007;79(3):1079-86.
94. Coleman WM, Lawrence BM. A Comparison of Selected Analytical Approaches to the Analysis of an Essential Oil. *Flavour Fragr J.* 1997;12(1):1-8.
95. Joulain D. Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse. *Perfum Flavorist.* 1994;19:5–17.
96. Paolini J. Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux Asteraceae endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*. 12 déc 2005 [cité 16 juin 2019]; Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00441322>
97. Joulain D, König WA. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. EB-Verlag; 1998.

Références bibliographiques

98. McLafferty FW, Stauffer DB. Wiley Registry of Mass Spectral Data, Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, Version 3.10 d. Palisade Newfield. 1994;
99. Liang Y-Z, Xie P, Chan K. Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr B*. 5 déc 2004;812(1):53-70.
100. Chericoni S, Flamini G, Campeol E, Cioni PL, Morelli I. GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. *Biochem Syst Ecol*. 1 avr 2004;32(4):423-9.
101. Vernin G, Boniface C, Metzger J, Ghiglione C, Hammoud A, Suon K-N, et al. GC-MS-SPECMA bank analysis of *Juniperus communis* needles and berries. *Phytochemistry*. 1988;27(4):1061-1064.
102. Cavaleiro CMF. Óleos Essenciais *Juniperus* de Portugal I e II [PhD Thesis]. 2001.
103. SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (IRTF) - PDF [Internet]. [cité 16 juin 2019]. Disponible sur: <https://docplayer.fr/16219059-Spectroscopie-infrarouge-a-transformee-de-fourier-irtf.html>
104. Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol*. 1 févr 2001;74(2):113-23.
105. Galvão LC de C, Furletti VF, Bersan SMF, da Cunha MG, Ruiz ALTG, Carvalho JE de, et al. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects [Internet]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012 [cité 16 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/751435/abs/>
106. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res*. 2007;21(4):308-23.
107. Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr J*. 2012;27(1):13-39.
108. Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. Mechanism of Action of Spanish Oregano, Chinese Cinnamon, and Savory Essential Oils against Cell Membranes and Walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*. 1 mai 2006;69(5):1046-55.
109. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol*. févr 1998;26(2):118-22.
110. Tsao S-M, Yin M-C. In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *J Med Microbiol*. 2001;50(7):646-649.
111. Hayes AJ, Markovic B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (lemon myrtle). Part 2. Absorption and histopathology following application to human skin. *Food Chem Toxicol*. 2003;41(10):1409-1416.

Références bibliographiques

112. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin Microbiol Rev. 1 janv 2006;19(1):50-62.
113. Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen Bacillus cereus. Appl Environ Microbiol. 1 avr 2002;68(4):1561-8.
114. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils - Dorman - 2000 - Journal of Applied Microbiology - Wiley Online Library [Internet]. [cité 16 juin 2019]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
115. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J Food Microbiol. 1 août 2004;94(3):223-53.
116. Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, et al. Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. J Agric Food Chem. 1 juill 2007;55(15):6300-8.
117. Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK. Food antioxidants: Technological: Toxicological and health perspectives. CRC Press; 1995.
118. Caillet S, Lacroix M. Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Lab Rech En Sci Appliquées À Aliment RESALA INRS-Inst Armand-Frappier Univ Laval Qué. 2007;
119. Lemon grass (Cymbopogon citratus) essential oil as... - Google Scholar [Internet]. [cité 16 juin 2019]. Disponible sur: https://scholar.google.fr/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&q=Lemon+grass+%28Cymbopogon+citratus%29+essential+oil+as+a+potent+anti-inflammatory+and+antifungal+drugs&btnG=
120. Studies on the mode of action of the essential oil of Lavender Lavandula angustifolia P. Miller) - Lis-Balchin - 1999 - Phytotherapy Research - Wiley Online Library [Internet]. [cité 23 juin 2019]. Disponible sur: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199909\)13:6%3C540::AID-PTR523%3E3.0.CO;2-I](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1099-1573(199909)13:6%3C540::AID-PTR523%3E3.0.CO;2-I)
121. Rho K-H, Han S-H, Kim K-S, Lee MS. Effects of aromatherapy massage on anxiety and self-esteem in korean elderly women: a pilot study. Int J Neurosci. 2006;116(12):1447–1455.
122. Park MK, Lee ES. The effect of aroma inhalation method on stress responses of nursing students. J Korean Acad Nurs. 2004;34(2):344–351.
123. Millet F. Le guide Marabout des huiles essentielles: se soigner par l'aromathérapie au quotidien. Marabout; 2010.
124. Lim WC, Seo JM, Lee CI, Pyo HB, Lee BC. Stimulative and sedative effects of essential oils upon inhalation in mice. Arch Pharm Res. 2005;28(7):770–774.

Références bibliographiques

125. Scimeca D. Les plantes du bonheur, Ed. Alpen; 2007.
126. Festy D., Les huiles essentielles ça marche! Avec 78 formules à commander en pharmacie, LEDUC.S EDITION, 2011, p. 22-26.
127. LE MONITEUR DES PHARMACIES. Cahier pratique : Aromathérapie, le bon usage. 2009, (2767) : 21p.
128. Carlsen K, Weismann K. Phytophotodermatitis in 19 children admitted to hospital and their differential diagnoses: Child abuse and herpes simplex virus infection. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(5):S88–S91.
129. Barlier L. Etat des lieux de l'utilisation des huiles essentielles au CHU d'Angers (de 2000 à 2013). 2014;
130. Roux D., 2011, Conseil en aromathérapie. 2e éd. Pays-Bas : Pro-Officina, 187 pages.
131. RAYNAUD J. Prescription et conseil en aromathérapie. Paris : Tec & Doc, 2006. 247 p.
132. Benabid A. Flore et écosystèmes du Maroc: Evaluation et préservation de la biodiversité. 2000;
133. Quezel P, Santa S, Schotter O. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales-v. 1-2. 1962;
134. Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi Motamed M, Ghorbani A. Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iran J Pharm Res.* 2010;63–79.
135. Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, Chelghoum C. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of .
136. Nickavar B, Mojab F, Dolat-Abadi R. Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chem.* 2005;90(4):609–611.
137. Saidj F-Extraction de l'huile essentielle de thym: *Thymus numidicus* kabylica- Thèse de magistère en Technologie.
138. Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int J Infect Dis.* 2006;10(3):236–241.
139. KULEVANOVA S, PANOVSKA TK. Inhibition of thermal autooxidation of lard by antioxidative action of *Thymus* extracts. *Acta Pharm.* 2002;52(1):29–35.
140. *Origanum vulgare* (Origan commun, Marjolaine sauvage) [Internet]. AquaPortail. [cité 6 juill 2019]. Disponible sur: <https://www.aquaportail.com/fiche-plante-3743-origanum-vulgare.html>
141. Morales R, Biskup ES, Sáez F. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. *Thyme Genus Thymus.* 2002;1:1–43.

Références bibliographiques

142. Teuscher E, Anton R, Lobstein A. Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc; 2005.
143. Mebarki N. Extraction de l'huile essentielle de thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse antimicrobienne [PhD Thesis]. 2010.
144. Kintzios SE. Oregano: the genera Origanum and Lippia. CRC press; 2002.
145. Rao GV, Mukhopadhyay T, Annamalai T, Radhakrishnan N, Sahoo MR. Chemical constituents and biological studies of Origanum vulgare Linn. Pharmacogn Res. 2011;3(2):143.
146. etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de Thymus ciliatus eu ciliatus de la region de tlemcen .Benslima.
147. Bouanani A. Hydrologie, Transport solide et Modélisation: Etude de quelques sous bassins de la Tafna (NW-Algérie). Th Doct D'état Univ Abou Bekr BELKAID Tlemcen. 2004;
148. BRUNETON J. Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales - (5^o Edition).Lavoisier; 2016.
149. Amarti F, El Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Farah A, et al. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de Thymus zygis du Maroc. Phytothérapie. 2011;9(3):149.
150. Boughendjioua H. Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Compos Chim Act Antioxyd Antimicrob Huiles Essent Citrus Limon Cinnamomum Zeylanicum Thymus Numidicus Dr En Sci Spéc Biol Végétale Univ Badji Moktar Annaba. 2014;117:125–130.
151. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol. 2004;26(2):211-9.
152. Tepe B, Sökmen M, Akpulat HA, Sokmen A. Screening of the antioxidant potentials of six Salvia species from Turkey. Food Chem. 1 mars 2006;95:200-4.
153. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils - Dorman - 2000 - Journal of Applied Microbiology - Wiley Online Library [Internet]. [cité 16 juin 2019]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
154. BELHADJ H. Activités antioxydantes et l'effet hémolytique des huiles essentielles de Thymus ciliatus ssp-euciliatus et d'Ammoïdes Verticillata [PhD Thesis].
155. Bousmaha-Marroki L, Atik-Bekkara F, Tomi F, Casanova J. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of Thymus ciliatus (Desf.) Benth. ssp. euciliatus Maire from Algeria. J Essent Oil Res. 2007;19(5):490–493.
156. Ghorab H, Kabouche A, Kabouche Z. Comparative compositions of essential oils of Thymus growing in various soils and climates of North Africa. Sahara. 2014;355(2):13.

Références bibliographiques

157. El Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B, Amarti F, Rahouti M, Aafi A, et al. Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois. *Acta Bot Gallica*. 2010;157(2):285–294.
158. Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, et al. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol Agron Société Environ*. 2010;14(1):141–148.
159. Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*. 2008;19(7):681–687.
160. Phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *origanum vulgare* from Morocco. [Internet]. [cité 8 juill 2019]. Disponible sur: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113194453>
161. Mechergui K, Coelho JA, Serra MC, Lamine SB, Boukhchina S, Khouja ML. Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *J Sci Food Agric*. 2010;90(10):1745–1749.
162. Bouhaddouda N, Aouadi S, Labiod R. Evaluation of chemical composition and biological activities of essential oil and methanolic extract of *Origanum vulgare* L. ssp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Algeria. *Int J Pharmacogn Phytochem Res*. 2016;8:104–112.
163. Mahfouf N. Étude de l'espèce *Origanum vulgare* L. 2018;
164. Mills E, Dugoua J-J, Perri D, Koren G. Herbal medicines in pregnancy and lactation: an evidence-based approach. CRC press; 2006.
165. Sari M. Étude biologique et phytochimique de l'origan *origanum vulgare* L. ssp. *glandulosum* Desf. (Ietswaart) espèce endémique d'Algérie-Tunisie. 2018;
166. Nina S, Ratiba S, Tarek H. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils of *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* from Annaba-Algeria.
167. Amrouni S, Touati M, Hadeff Y, Djahoudi A. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénèmase. *Phytothérapie*. 2014;12(5):309-13.
168. El Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B, Amarti F, Rahouti M, Aafi A, et al. Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois. *Acta Bot Gallica*. 2010;157(2):285-94.
169. Lu Y, Foo LY. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem*. 2001;75(2):197–202.

Références bibliographiques

170. Singh G, Marimuthu P, de Heluani CS, Catalan CA. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. *J Agric Food Chem.* 2006;54(1):174–181.
171. Sari M, Biondi DM, Kaâbeche M, Mandalari G, D'Arrigo M, Bisignano G, et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour Fragr J.* 2006;21(6):890–898.
172. Bouyahya A, Dakka N, Talbaoui A, Et-Touys A, El-Boury H, Abrini J, et al. Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (*Origanum compactum* Benth). *Ind Crops Prod.* 2017;108:729–737.
173. Bedi G, Tonzibo ZF, Oussou KR, Choppard C, Mahy JP, Nrsquo TY. Effect of essential oil of *chromoleana odorata* (Asteraceae) from ivory coast, on cyclooxygenase function of prostagladin-H synthase activity. *Afr J Pharm Pharmacol.* 2010;4(8):535–538.
174. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem.* 2003;10(10):813–829.
175. Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G, et al. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chem.* 2004;84(4):519–525.
176. Miladi H, Slama RB, Mili D, Zouari S, Bakhrouf A, Ammar E. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Nat Sci.* 2013;5(6):729–39.
177. Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.* 2007;102(3):898–904.
178. Sarikurkcu C, Zengin G, Oskay M, Uysal S, Ceylan R, Aktumsek A. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Ind Crops Prod.* 2015;70:178-84.
179. Jamali CA, El Bouzidi L, Bekkouche K, Lahcen H, Markouk M, Wohlmuth H, et al. Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. *Chem Biodivers.* 2012;9(6):1188–1197.
180. Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN, Neffati M, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chem.* 2007;105(1):146–155.
181. Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 2000;69(2):167–174.

Références bibliographiques

182. Miguel G, Simoes M, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Carvalho L. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chem.* 2004;86(2):183–188.
183. Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem.* 2006;54(5):1822–1828.
184. Aazza S, Lyoussi B, Miguel MG. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules.* 2011;16(9):7672–7690.
185. Shahat A, Ibrahim A, Hendawy S, Omer E, Hammouda F, Abdel-Rahman F, et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules.* 2011;16(2):1366–1377.
186. Misharina TA, Samusenko AL. Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. *Appl Biochem Microbiol.* 2008;44(4):438–442.
187. Tsai M-L, Lin C-C, Lin W-C, Yang C-H. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;1108312632–1108312632.
188. Jukić M, Miloš M. Catalytic oxidation and antioxidant properties of thyme essential oils (*Thymus vulgarae* L.). *Croat Chem Acta.* 2005;78(1):105–110.
189. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *J Ethnopharmacol.* 2006;106(3):290–302.
190. Imelouane B, Amhamdi H, Wathelet J-P, Ankit M, Khedid K, El Bachiri A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *Int J Agric Biol.* 2009;11(2):205–208.
191. Brđjanin S, Bogdanović N, Kolundžić M, Milenković M, Golić N, Kojić M, et al. Antimicrobial activity of oregano (*Origanum vulgare* L.): And basil (*Ocimum basilicum* L.): Extracts. *Adv Technol.* 2015;4(2):5–10.
192. de Lima Marques J, Volcão LM, Funck GD, Kroning IS, da Silva WP, Fiorentini ÂM, et al. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. *Ind Crops Prod.* 2015;77:444–450.
193. Sađdic O (2003) Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm-Wiss U-Technol* 3.
194. Rasooli I, Mirmostafa SA. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *J Agric Food Chem.* 2003;51(8):2200–2205.

Références bibliographiques

195. Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J Food Prot.* 2004;67(6):1252–1256.
196. Bezić N, Skočibušić M, Dunkić V, Radonić A. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. *Phytother Res Int J Devoted Pharmacol Toxicol Eval Nat Prod Deriv.* 2003;17(9):1037–1040.
197. Skocibusic M, Bezić N, Dunkić V. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chem.* 2006;96(1):20–28.
198. Jalsenjak, V., S. Peljnjak and D. Kustrak, 1987. Microcapsules of sageoil, essential oils content and antimicrobial acti.
199. Sivropoulou A, Nikolaou C, Papanikolaou E, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J Agric Food Chem.* 1997;45(8):3197–3201.
200. Sur SV, Tuljupa FM, Sur LI. Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants. *J Chromatogr A.* 1991;542:451–458.
201. de Barros JC, da Conceição ML, Neto NJG, da Costa ACV, Júnior JPS, Junior IDB, et al. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT-Food Sci Technol.* 2009;42(6):1139–1143.
202. Simoes M, Bennett RN, Rosa EA. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Nat Prod Rep.* 2009;26(6):746–757.
203. Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJ-P, Bégin A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int J Food Microbiol.* 1997;37(2-3):155–162.
204. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000;88(2):308–316.
205. Rhayour K, Bouchikhi T, Tantaoui-Elaraki A, Sendide K, Remmal A. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Essent Oil Res.* 2003;15(5):356–362.
206. Chami F, Chami N, Bennis S, Bouchikhi T, Remmal A. Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytother Res Int J Devoted Pharmacol Toxicol Eval Nat Prod Deriv.* 2005;19(5):405–408.
207. KHRIBCH J, NASSIK S, EL HOUADFI M, ZRIRA S, OUKESSOU M. Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire. *Rev Marocaine Sci Agron Vét.* 2018;6(3):300–307.

Références bibliographiques
