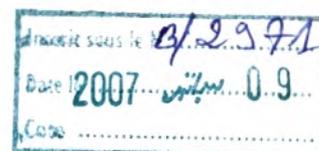


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

UNIVERSITÉ ABOU
BAKR BELKAID
-TLEMCEEN-



FACULTÉ DES
SCIENCES
DEPARTEMENT DE
BIOLOGIE



Mémoire de Magister

Présenté par M^{elle} HADDOUCHI Farah

En vue de l'obtention du

DIPLOME DE MAGISTER EN BIOLOGIE

OPTION : SUBSTANCES NATURELLES, ACTIVITES BIOLOGIQUES ET SYNTHESE.

Contribution à l'Etude des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* (Zaâteur) de la région de Mostaganem et de *Laurus nobilis* (Rend) de la région de Tlemcen (Nedroma).

Activités antibactériennes et antifongiques en fonction de leur conservation.

Soutenu le 02 Juillet 2007 devant le jury composé de :

- | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| • M ^r TALEB-BENDIAB S.A. | <i>Professeur</i> | <i>Président.</i> |
| • M ^{me} ATIK BEKKARA F. | <i>Professeur</i> | <i>Examinatrice.</i> |
| • M ^r BOUAZZA M. | <i>Professeur</i> | <i>Examineur.</i> |
| • M ^r MOUSSAOUI A. | <i>Maître de conférence</i> | <i>Examineur.</i> |
| • M ^r BENMANSOUR A/Fid. | <i>Maître de conférence</i> | <i>Promoteur.</i> |
| • M ^r LAZOUNI H.A. | <i>Chargé de cours</i> | <i>Co-promoteur.</i> |

Année Universitaire : 2006-2007

Je dédie ce mémoire à:

*Mes très chers parents pour leur amour, soutien et encouragements durant
toutes mes études, que dieu les protège ;*

Ma chère petite soeur Khadîdja et mes frères Khalid et youcef ;

Mon oncle Lahcène pour son aide et ses encouragements ;

Mes très chères amies :

*Samira, Zaket, Sihem, Amina et Fatima pour leur compréhension et leur
gentillesse, qu'elles trouvent ici le témoignage de ma profonde amitié,*

*Naila, Amel (2), Amani, Imène, Darine, Meriem, Karima, Zakia, Wassila,
Asma et Aouatif.*

Mes amis Tarik, Rachid, Reda et Adel.

Ma promotion de Magister 2004-2005

Ainsi qu'à toute ma famille et à mes ami(e)s d'ici ou d'ailleurs.

FARAH

Remerciements

Le présent travail a été réalisé aux laboratoires des produits naturels (LAPRONA) de l'université de Tlemcen.

Tous mes remerciements vont à Monsieur BENMANSOUR A., maître de conférence au département de biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen pour avoir suivi ce travail avec disponibilité, patience et bienveillance. Vous avez tout mon respect et toute mon admiration.

Je tiens à remercier Monsieur TALEB-BENDIAB S.A. Professeur au département de chimie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen qui nous fait le grand honneur de présider ce jury.

Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur LAZOUNI H.A. Chargé de cours au département de biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen pour avoir participer à la direction de ce travail. C'est une chance pour moi d'avoir eu l'occasion de travailler avec vous pour la deuxième fois.

Madame ATIK BEKKARA F. Professeur au département de biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen, je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de faire partie des membres du jury.

Monsieur MOUSSAOUI A. Maître de conférence au département de biologie, Centre universitaire de Bechar, je vous remercie d'avoir accepter de juger ce travail.

Monsieur BOUAZZA M. Professeur au département de biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen, je vous remercie d'avoir accepter d'examiner ce travail

Mes remerciements vont également à tous ceux et celles qui de près ou de loin m'ont aidé à réaliser ce travail en particulier M^{elle} Baba Ahmed Z.Z., M^{elle} Terbeche I., M^{elle} Khaldi D., Chaouche S., Azzi R., Dahmani A., Amel S., Rahmoun N. et Douzi K,

Merci

Abréviations

- ↘ **AFNOR** : Association Française de Normalisation.
- ↘ **Al.** : Collaborateur.
- ↘ **%**: Pourcentage.
- ↘ **°C**: Degré Celsius.
- ↘ **CCM**: Chromatographie en couche mince.
- ↘ **CPG**: Chromatographie en phase gazeuse.
- ↘ **CG** : Chromatographie en phase gazeuse.
- ↘ **CL** : Chromatographie en phase liquide.
- ↘ **cm** : Centimètre.
- ↘ **D**: Longueur d'onde.
- ↘ **DO** : Densité optique.
- ↘ **d₂₀²⁰**: Densité relative a 20°C.
- ↘ **DL**: Dose létale.
- ↘ **Fig.**: Figure.
- ↘ **g**: Gramme.
- ↘ **h** : heure.
- ↘ **HE**: Huile essentielle.
- ↘ **HPLC** : Chromatographie liquide haute performance.
- ↘ **IA**: Indice d'acide.
- ↘ **IE**: Indice d'ester.
- ↘ **IP**: Indice de peroxyde.
- ↘ **I_I** : Indice d'iode.
- ↘ **J**: Jours.
- ↘ **Kg**: Kilogramme.
- ↘ **mg**: Milligramme.
- ↘ **ml**: Millilitre.
- ↘ **mm**: Millimètre.
- ↘ **nm** : nanomètre
- ↘ **N°**: Numéro.
- ↘ **Nbre**: Nombre.
- ↘ **Rdt**: Rendement.
- ↘ **T** : *Thymus*.
- ↘ **T°**: Température.
- ↘ **Tab.**: Tableau.
- ↘ **UFC** : Unité Formant Colonie.
- ↘ **UV**: Ultra violet.
- ↘ **V**: Volume.
- ↘ **µg** : Microgramme.
- ↘ **µl** : Microlitre.

Glossaire

Allergie : modification nocive du milieu hormonal provoquée par un produit quelconque.

Analgésique : Substance qui diminue ou supprime la sensation de douleur.

Antalgique : qui atténue ou fait disparaître la douleur.

Antibiotique : qui s'oppose à la vie. Substance qui empêche le développement des microbes.

Antifongique : Substance active contre les champignons et les levures parasites.

Antispasmodique : qui combat les spasmes en relâchant les fibres musculaires lisses.

Antiseptique : qui détruit les microbes.

Antitussif: Médicament calmant la toux.

Astringent : qui resserre les tissus.

Bactéricide : qui tue les bactéries.

Bactériostatique : action des substances qui suspendent la division des bactéries.

Balsamique : substance odorante, qui adoucit les muqueuses respiratoires.

Ballonnement : aérophagie. Propension particulière pour l'abdomen à augmenter le volume après les digestions.

Béchique : calme la toux.

Carminatif : qui chasse les gaz intestinaux.

Contusions : blessures.

Curatives : Destiné à la guérison des maladies.

Dextrogyre : qui dévie à droite la polarisation de la lumière.

Diurétique : Qui favorise l'élimination des urines et en augmente le volume.

Dyspepsie : digestion difficile, lente et douloureuse.

Emménagogue : qui provoque ou favorise les règles.

Expectorant : qui favorise l'élimination des substances présentes dans les poumons et les bronches.

Insomnie : Trouble du sommeil.

Lévogyre : qui fait dévier la polarisation de la lumière à gauche.

Pédiculose : ensemble des états morbides déterminés par les poux sur une partie du corps.

Psoriasis : affection cutanée caractérisée essentiellement par l'apparition de squames blanchâtres ou nacrés sèches qui s'enlèvent par le grattage, et qui saignent facilement.

Stimulant : qui a un effet favorable sur le corps ou l'esprit.

Stomachique : qui active la digestion.

Sudorifique : qui fait transpirer.

Tonique : Qui fortifie, stimule les forces de l'organisme.

Totum : ensemble des constituants d'une plante qui abouti à une valeur associative agissant en synergie.

Liste des tableaux :

- **Tableau 01** : Les différentes classes des terpénoïdes.
- **Tableau 02** : Méthodes d'extraction, isolation, séparation et identification des métabolites secondaires.
- **Tableau 03** : Récolte, séchage et conservation des plantes.
- **Tableau 04** : Les procédés d'extraction des huiles essentielles.
- **Tableau 05** : Propriétés physiques et organoleptiques des huiles essentielles.
- **Tableau 06** : Activités biologiques de molécules aromatiques selon leur fonction chimique.
- **Tableau 07** : Composition chimique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*.
- **Tableau 08** : Composition chimique des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Thymus*.
- **Tableau 09** : Situation géographique et étage bioclimatique des stations d'étude.
- **Tableau 10** : Tests phytochimiques réalisés sur différents extraits préparés à partir des feuilles du Laurier.
- **Tableau 11** : Tests phytochimiques réalisés sur différents extraits préparés à partir des feuilles du Thym.
- **Tableau 12** : Indices de mousse de *Laurus nobilis* et *Thymus fontanesii*.
- **Tableau 13** : Recherche des composés réducteurs, polyuronides, amidon et acides gras dans les feuilles de *Laurus nobilis*.
- **Tableau 14** : Recherche des composés réducteurs, polyuronides, amidon et acides gras dans les feuilles de *Thymus fontanesii*.
- **Tableau 15** : Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites.
- **Tableau 16** : Les rendements en huiles essentielles du laurier et du thym.
- **Tableau 17** : Comparaison des rendements en huiles essentielles du laurier et du thym avec ceux de la littérature.
- **Tableau 18** : Les rendements en extraits hydrosolubles extraits à partir des Hydrolats.
- **Tableau 19** : Propriétés organoleptiques des extraits hydrosolubles extraites.
- **Tableau 20** : Les indices physico-chimiques des huiles essentielles fraîchement extraites du thym et du laurier.
- **Tableau 21** : Comparaison des caractères physiques d'HE de *Thymus fontanesii* avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs pour les différentes espèces du genre *Thymus*.
- **Tableau 22** : Comparaison des caractères chimiques d'HE de *Thymus fontanesii* avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs pour les différentes espèces du genre *Thymus*.
- **Tableau 23** : Comparaison des caractères physicochimiques d'HE de *Laurus nobilis* avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs.
- **Tableau 24** : Indices physiques des extraits hydrosolubles des eaux aromatiques.
- **Tableau 25** : Variation des indices chimiques de l'huile essentielle du Laurier au cours du temps et en fonction de sa conservation.
- **Tableau 26** : Variation des indices chimiques de l'huile essentielle du Thym au cours du temps et en fonction de sa conservation.

- **Tableau 27 :** Le suivi des indices chimiques des huiles essentielles du *Thymus ciliatus* et du *Thymus fontanesii* au cours du temps et en fonction de leur conservation obtenu aux travaux antérieurs.
- **Tableau 28 :** Le suivi des indices chimiques de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* au cours du temps et en fonction de sa conservation obtenu par Sari H.
- **Tableau 29 :** Provenance des germes étudiés.
- **Tableau 30 :** Les méthodes utilisées dans l'étude du pouvoir antimicrobien de nos huiles essentielles.
- **Tableau 31 :** Résultats de la vérification de la pureté des souches bactériennes.
- **Tableau 32 :** Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition pour des disques imprégnés de 10 µl d'huiles essentielles.
- **Tableau 33 :** Quantités d'huiles essentielles déposées dans des disques pour aromagramme de 6mm de diamètre.
- **Tableau 34 :** Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) selon la méthode de Vincent (pour 10 µl d'huiles essentielles).
- **Tableau 35 :** Les diamètres des zones d'inhibitions des différentes souches (en mm) selon la méthode de Vincent (pour 3 µl d'huiles essentielles).
- **Tableau 36 :** Les surfaces d'inhibition des différentes souches et les coefficients d'activité de l'huile essentielle du thym.
- **Tableau 37 :** Comparaison des diamètres d'inhibition avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs pour l'huile essentielle du laurier.
- **Tableau 38 :** Comparaison des diamètres d'inhibition avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs pour les huiles essentielles du Thym.
- **Tableau 39 :** Nature de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du thym.
- **Tableau 40 :** Suivi de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du laurier en fonction de temps et de sa conservation.
- **Tableau 41 :** Suivi de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du thym en fonction de temps et de sa conservation.
- **Tableau 42 :** Gamme de concentrations de l'huile essentielle du thym utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.
- **Tableau 43 :** Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* selon la méthode de contact direct.
- **Tableau 44 :** Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii* obtenues par la méthode de contact direct.
- **Tableau 45 :** Comparaison des CMI (µg/ml) de l'huile essentielle du Thym avec celles déterminées pour 6 chemotypes de *Thymus vulgaris*.
- **Tableau 46 :** Les diamètres des zones d'inhibition de la souche de *Candida albicans* (en mm) selon la méthode de Vincent.
- **Tableau 47 :** Comparaison des diamètres d'inhibition de la souche de *Candida albicans* (en mm) avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs.

- **Tableau 48** : Gamme de concentrations de l'huile essentielle du thym utilisée pour l'évaluation de l'activité antifongique.
- **Tableau 49** : Gamme de concentrations de l'huile essentielle du laurier utilisée pour l'évaluation de l'activité antifongique.
- **Tableau 50** : Pouvoir antifongique de l'huile essentielle du thym selon la méthode de contact direct.
- **Tableau 51** : Pouvoir antifongique de l'huile essentielle du laurier selon la méthode de contact direct.
- **Tableau 52** : Comparaison du pouvoir antifongique de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii* par méthode de contact direct avec les travaux antérieurs.
- **Tableau 53** : Comparaison du pouvoir antifongique de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* par méthode de contact direct avec un travail antérieur.
- **Tableau 54** : Les pourcentages d'inhibition des huiles essentielles du thym et du laurier.
- **Tableau 55** : Comparaison des pourcentages d'inhibition des huiles essentielles du thym et du laurier avec deux travaux antérieurs.

Liste des figures :

- **Figure 01** : Relation entre les métabolismes primaire et secondaire.
- **Figure 02** : Un aperçu des interactions entre métabolisme primaire et secondaire.
- **Figure 03** : Illustration de la méthode des aromatochromes sur boîte de Pétri.
- **Figure 04** : Illustration de la méthode des chromatogrammes.
- **Figure 05** : Carte de localisation des stations d'étude.
- **Figure 06** : Courbe de variation de l'IA de l'IE du *Laurus nobilis*.
- **Figure 07** : Courbe de variation de l'IE de l'IA du *Laurus nobilis*.
- **Figure 08** : Courbe de variation de l'IP de l'IA du *Laurus nobilis*.
- **Figure 09** : Courbe de variation de l'II de l'IA du *Laurus nobilis*.
- **Figure 10** : Courbe de variation de l'IA de l'IE du *Thymus fontanesii*.
- **Figure 11** : Courbe de variation de l'IE de l'IA du *Thymus fontanesii*.
- **Figure 12** : Courbe de variation de l'IP de l'IA du *Thymus fontanesii*.
- **Figure 13** : Courbe de variation de l'II de l'IA du *Thymus fontanesii*.

Liste des photos :

- Les plantes étudiées.
- Les aromatogrammes de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*.
- Les aromatogrammes de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*.
- Prélèvements sur la surface de la gélose nutritive.
- Méthode de contact direct pour les bactéries.
- Antifongigramme : *Candida albicans*.
- Méthode de contact direct pour les champignons sur gélose aux.

Sommaire

Introduction	01
Première partie : Etude bibliographique	
Premier chapitre : Les métabolites secondaires et leurs effets thérapeutiques	
I. Classification des métabolites secondaires.....	02
I.1. Les composés phénoliques.....	02
I.2. Les isoprénoides.....	05
I.3. Les composés azotés.....	05
II. Biosynthèse des métabolites secondaires.....	06
➤ Biosynthèse des essences.....	08
III. Isolation, caractérisation et évaluation des métabolites secondaires.....	10
IV. Fonctions des métabolites secondaires.....	10
V. Application des produits phytothérapeutiques.....	11
☛ Récolte et conservation des plantes.....	12
☛ Propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires.....	13
☛ Les effets secondaires.....	13
Deuxième chapitre : Les Huiles Essentielles	
I. Définition, localisation et répartition botanique.....	15
II. Teneurs.....	16
III. Les procédés d'extraction des huiles essentielles.....	16
IV. Propriétés physiques et organoleptiques des huiles essentielles.....	18
V. Composition des huiles essentielles.....	19
VI. Classification des huiles essentielles.....	20
VII. Le Contrôle analytique et les facteurs de stabilité des huiles essentielles.....	22
VIII. Traitements ultérieurs des huiles essentielles.....	23
IX. Fonction des huiles essentielles.....	23
X. Activités biologiques de huiles essentielles.....	24
☛ Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	25
• Méthodes de détermination de l'efficacité.....	26
• Mode d'action des huiles essentielles.....	28
☛ Les travaux antérieurs.....	29
XI. Applications thérapeutiques.....	33
• Absorption et élimination des huiles essentielles.....	34
• Effets secondaires des huiles essentielles.....	34
Troisième chapitre : Les Plantes étudiées	
I. Le laurier noble.....	36
II. Le thym.....	39
Deuxième partie : Etude expérimentale	
Premier chapitre : Etude phytochimique	
I. Provenance des plantes étudiées.....	42
II. Tests phytochimiques.....	44
1. Résultats.....	44
2. Interprétation des résultats.....	47
3. Conclusion.....	48
III. Extraction des huiles essentielles.....	49

➤	Teneurs en huiles essentielles.....	49
➤	Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites.....	50
➤	Extraction des extraits hydrosolubles à partir des Hydrolats.....	51
➤	Propriétés organoleptiques des extraits hydrosolubles des eaux aromatiques.....	51
	Deuxième chapitre : Etude physicochimique des huiles essentielles	
I.	Contrôle de qualité des huiles essentielles du <i>Laurus nobilis</i> et du <i>Thymus fontanesii</i>	52
1.	Résultats.....	52
2.	Discussion.....	53
II.	Evolution des caractères chimiques au cours du temps.....	59
1.	Résultats.....	59
2.	Interprétation des résultats.....	66
3.	Conclusion.....	69
	Troisième chapitre : Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles	
I.	Introduction.....	70
II.	Les huiles essentielles testées.....	70
III.	Les souches microbiennes.....	71
1.	Origine.....	71
2.	Conservation.....	71
3.	Préparation des inoculums.....	71
4.	Concentration cellulaire des Inoculums.....	72
5.	Vérification de la pureté des souches bactériennes.....	72
IV.	Les milieux de culture.....	72
V.	Les méthodes utilisées.....	72
VI.	Expression des résultats.....	73
1.	Vérification de la pureté des souches bactériennes.....	73
2.	Etude de l'effet antibactérien des huiles essentielles étudiées.....	74
2-1.	Méthode de Vincent.....	74
➤	Nature de l'activité antibactérienne.....	82
➤	Etude de l'effet antibactérien des huiles essentielles en fonction de leur conservation.....	83
2-2.	Méthode de contact direct.....	84
●	En milieu solide.....	84
●	En milieu liquide.....	86
3.	Etude de l'effet antifongique des huiles essentielles étudiées.....	87
3-1.	<i>Candida albicans</i>	87
3-2.	les champignons filamenteux.....	89
➤	Les pourcentages d'inhibition.....	93
4.	Conclusion.....	95
	Conclusion générale	96
	Références bibliographiques	98
	Annexes	

Introduction

*En face de maints produits de synthèse dont
la renommée fut éphémère, les traitement
naturels, surtout les plantes, paraissent être
les seuls à se prévaloir d'une carrière si
lointaine qu'on n'en trouve pas le début, et
dont, pour l'heure, on ne saurait imaginer la
fin.*

Jean Valnet

Introduction générale

Le présent travail a pour but d'étudier les propriétés physicochimiques et microbiologiques des huiles essentielles de deux plantes aromatiques d'origines et de familles différentes et dont l'exploitation présente un grand intérêt. Elle porte également sur l'étude phytochimique des deux espèces. Il s'agit de ***Thymus fontanesii*** de la famille des labiées et de ***Laurus nobilis*** de la famille des lauracées.

Les huiles essentielles ainsi que les autres métabolites secondaires étudiés sont très utilisés par l'homme au moins depuis l'antiquité pour leurs propriétés médicinales, culinaires ou odoriférantes. Leur emploi néanmoins a toujours été pratiqué de façon empirique.

Nous avons choisi d'étudier ces deux plantes pour les raisons suivantes :

- Ce sont des plantes spontanées, très abondantes dans l'ouest algérien ;
- Elles sont largement utilisées en phytothérapie surtout comme antiseptiques, antispasmodiques et expectorants ;
- De nos jours, elles sont utilisées comme condiment ;
- Elles contiennent des flavonoïdes et des hétérosides ce qui n'est pas sans inconvénient sur le plan toxicologique ;
- Elles sont riches en huiles essentielles qui ont une activité antioxydante, antibactérienne, antifongique, anti- inflammatoire et insecticide.

Notre étude se compose de deux parties :

- Une synthèse bibliographique sur le sujet ;
- Une partie expérimentale dans laquelle nous présentons :
 - * Une étude phytochimique de ***Thymus fontanesii*** et de ***Laurus nobilis***;
 - * Une étude physicochimique des huiles essentielles de ces deux plantes ;
 - * Une étude microbiologique sur l'activité de ces huiles essentielles vis- à - vis des souches bactériennes et fongiques.

Première partie :

Etude bibliographique

Les métabolites secondaires Et leurs effets thérapeutiques

Le métabolisme primaire fournit des molécules de base : Carbohydrates (mono-, oligo- et polysaccharides -ex : Amidon-, sucres réducteurs ou non réducteurs), Lipides, acides aminés, protéines, acides nucléiques. Ces métabolites sont produits en quantité élevée par les plantes (63).

Les plantes produisent aussi une grande diversité de métabolites secondaires pour la défense et la survie dans l'écosystème (44).

I. Classification des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires dépassant actuellement 200000 substances identifiées appartiennent à 3 classes principales (63) :

1.1. Les composés phénoliques (dérivés des glucides) :

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une fonction : éther, ester, hétéroside (27).

1. Phénols et acides phénols :

On appelle phénols (C_6) les dérivés hydroxylés du benzène et des hydrocarbures aromatiques, dans lesquels le groupe OH est lié à un atome de carbone du cycle benzénique. Les dérivés polyhydroxylés sont appelés polyphénols (54). Il est rare de trouver les phénols libres dans les plantes (78).

Les acides phénols sont des dérivés en C_6-C_1 et C_6-C_2 . La plupart de ces composés proviennent de l'acide cinnamique (121).

Phénols	Acides phénols
Hydroquinones, catéchol, orcinol, phloroglucinol, pyrogallol, vanilline.	Acide p- hydroxybenzoïque, acide protocatéchique, acide vanillique, acide syringinique, acide gentisique, acide salicylique, acide o- protocatéchique, acide gallique, acide éllagique.

2. Tanins (C_{15})_n :

Ce sont des substances polyphénolique de structures variées, de saveur astringente, ayant la propriété de tanner la peau (111).

Ils ont la capacité de réagir avec les protéines, en formant des co- polymères stables et hydro-insolubles (78).

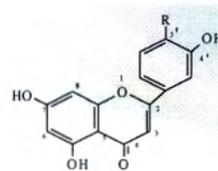
• Tanins Hydrolysables : sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre qui est très généralement le glucose et d'un nombre variable de molécules d'acide- phénol qui est soit l'acide gallique dans le cas des *tanins galliques*, soit l'acide hexahydroxy di- phénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation dans le cas des *tanins éllagiques* (27).

• Tanins condensés ou proanthocyanidols : Ils ne possèdent pas de sucre dans leurs molécules et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes (121). Ils sont formés par la condensation de catéchines ou gallocatéchines en formant des dimères (unités de flavanes) et ensuite des oligomères par de liaisons C4-C8 ou C6-C8 (78).

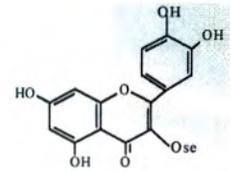
3. Flavonoïdes($C_6-C_3-C_6$) :

Ce sont des pigments jaunes généralement polyphénoliques. Selon **Middleton E. et al (2000) et Gibault T. (2001)**, on les divise en 6 classes :

• Les *flavones* et *flavonols* qui représentent la majorité des flavonoïdes, les *flavanols*, les *anthocyanidines*, les *flavanones* et les *chalcones*.



Flavones

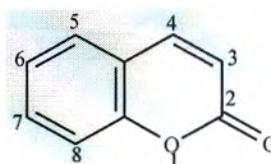


Flavanones

4. Phénylpropanoïdes :

Ils dérivent de l'acide aminé Phénylalanine et peuvent contenir un ou plusieurs résidus C_6-C_3 . Parmi les phénylpropanoïdes, on trouve :

- L'*acide hydroxy- cinnamique* (dérivés par estérification) qui est le plus répandu ;
- Les *coumarines* (dérivés par cyclisation) sont des lactones des acides 2- hydroxy- Z- cinnamiques (27). Elles possèdent une intense fluorescence bleue en lumière ultraviolette. On les divise en coumarines simples et coumarines complexes (furocoumarines, pyranocoumarines) (121).



coumarine

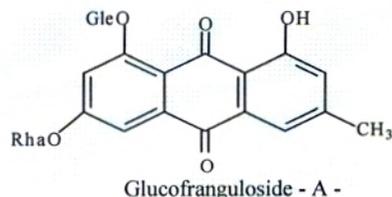
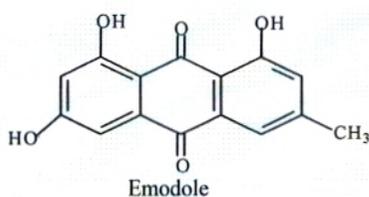
- Les *phénylpropènes* (dérivés directs) contribuent à la saveur parfumée et l'odeur des plantes.
- Les *lignanes* « dimères (C_6-C_3)₂ » (121) ; (78).

5. Quinones et Emodols :

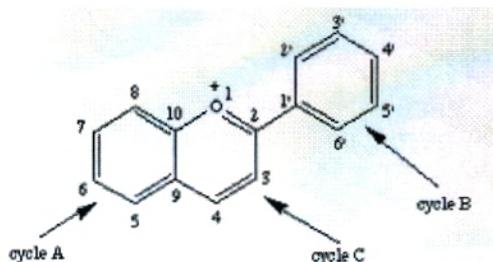
Les quinones sont des pigments naturels, la plupart sont jaunes pâles, rouges et bruns. Ces couleurs sont masquées par les autres pigments. On distingue 4 groupes :

- Benzoquinones (Arthropodes) ;
- Naphtoquinones (angiospermes) (78) ;
- Anthraquinones (assez répandues) : Ce sont des composés colorés en orangé rouge. Elles appartiennent à la famille des anthracénosides (regroupent tous les composés phénoliques et hétérosidiques) (153) ;
- Quinones isopréniques (photosynthèse et respiration) (78).

Les émodols sont des dérivés hydroxyanthracéniques. (153).



6. Anthocyanosides : Ce sont des pigment qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange de la plupart des fleurs et des fruits. (77), (25).



I.2. Les isoprénoides (un groupe de lipide) : **Stéroïdes et Terpénoides**

Ils constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux. (27).

Les terpènes sont classés en fonction du nombre d'unités d'isoprènes dont ils sont issus (67) ; (78) :

nbre d'unités	nbre de carbone	Classes	Différents types et occurrence		volatilité
2	C ₁₀	Monoterpénoides	Monoterpènes (constituants des huiles essentielles), Lactones monoterpéniques, Tropolones.		Les plus volatiles
3	C ₁₅	Sesquiterpénoides	Sesquiterpènes (constituants des huiles essentielles), Lactones sesquiterpéniques, Abscissines (acide abscissique)		
4	C ₂₀	Diterpénoides	Diterpènes résinoïdes, Diterpènes toxiques, Gibbérellines (acide gibbérellique).		moins volatiles
5	C ₂₅	Sesterpénoides			Non volatiles
6	C ₃₀	Triterpénoides	A l'état libre	Triterpènes Phytostérols	
			s/f d'hétérosides	Saponines : • sont des glycosides de triterpènes et stérols. • Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives.	
				Glycosides cardiaques	
8	C ₄₀	Tetraterpénoides	Caroténoïdes		
n	C _n	Polyterpénoides	Ex : caoutchouc		

Tableau 01 : Les différentes classes des terpénoides.

I.3. Les composés azotés (dérivés des acides aminés) : **Alcaloïdes**

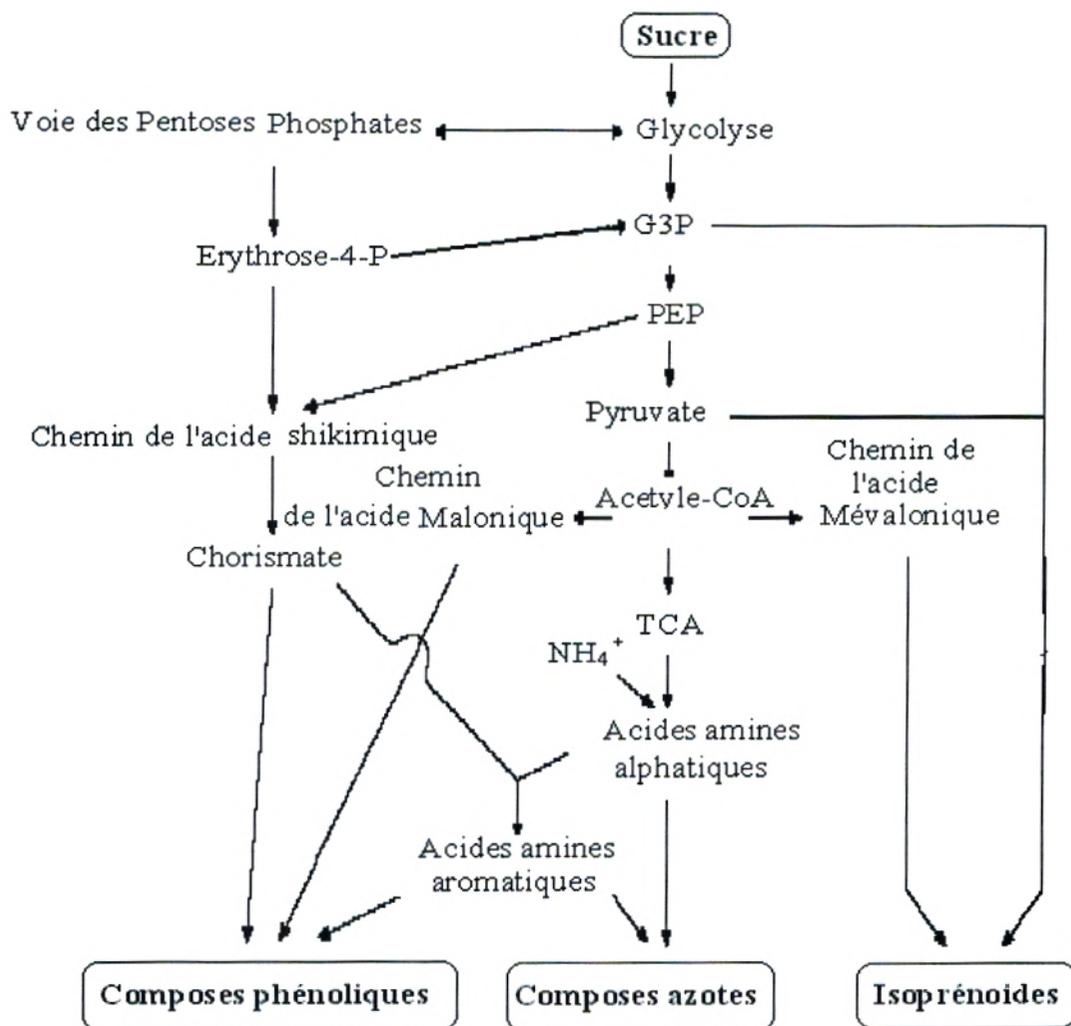
Les alcaloïdes sont une sous famille de composés azotés, qui désignent l'ensemble des composés azotés produits par les plantes qui ne sont pas classés dans les sous familles suivantes : peptides, acides aminés non protéiques, aminés, glycosides cyanogéniques, glucosinolates, cofacteurs, phytohormones et précurseurs des acides nucléiques (137). On distingue 3 classes (27) :

- **Alcaloïdes vrais (Alcaloïdes sels)** : ils existent à l'état de sels et sont formés à partir des acides aminés ;
- **Pseudo alcaloïdes (Alcaloïdes sels)** : ils ne dérivent pas des acides aminés ;
- **Proto alcaloïdes** : ils ont un caractère basique et sont élaborés à partir d'acides aminés.

II. Biosynthèse des métabolites secondaires :

Le métabolisme secondaire des plantes est lié au métabolisme primaire par 5 voies métaboliques principales : la voie de l'acide shikimique- acide malonique- acide mévalonique- acides aminés (149) et du G3P via la voie des pentoses phosphates (33)

Les précurseurs principaux de la plupart des métabolites secondaires sont l'acétyl- coenzyme A, l'erythrose-4-phosphate, phosphoénolpyruvate, acides aminés, pyruvate et le 3- phosphoglycérate. (149), (33).



G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate. **PEP** : phosphoénolpyruvate. **TCA** : cycle de l'acide citrique.

Fig01 : Relation entre les métabolismes primaire et secondaire (33).

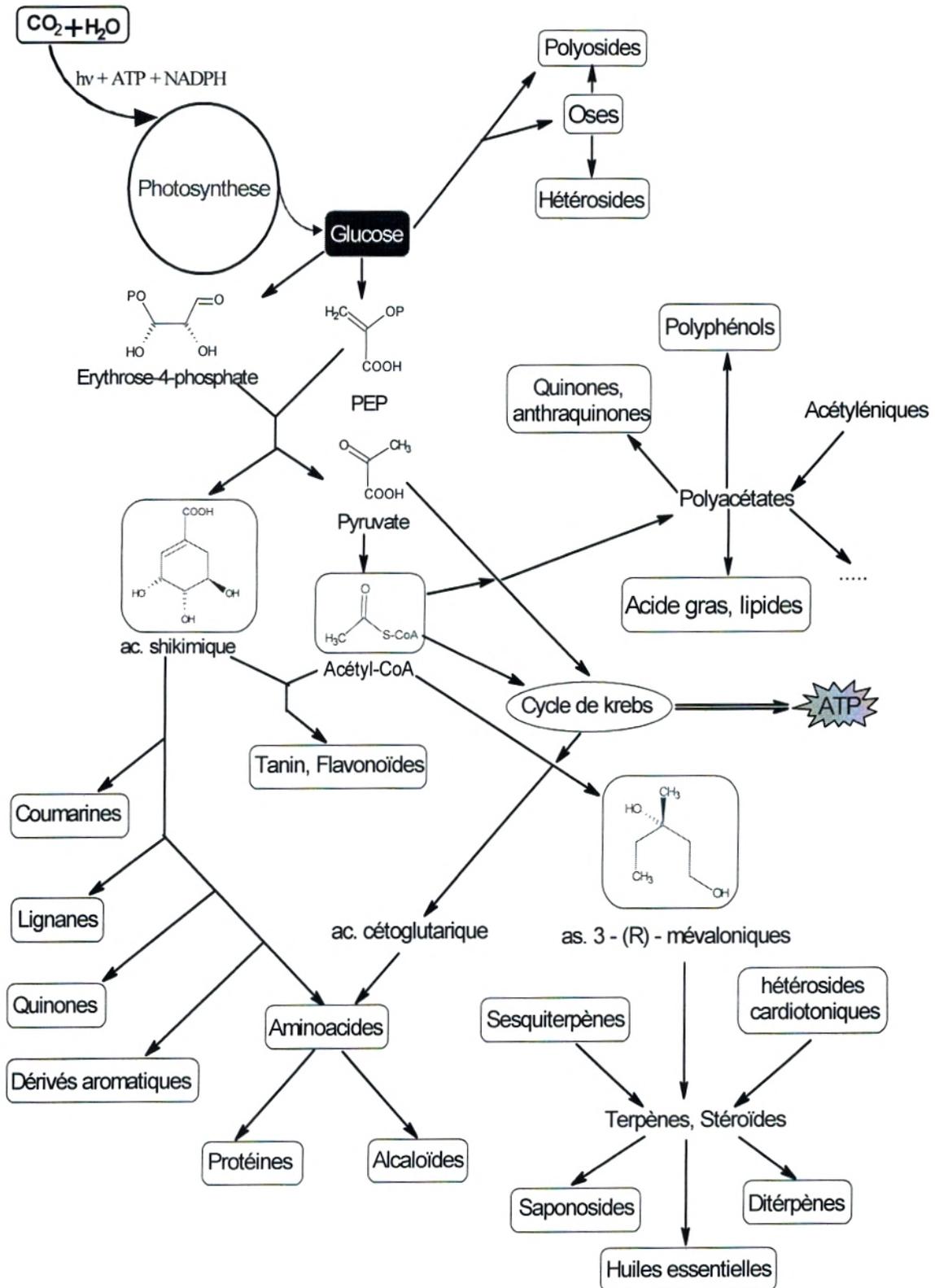


Fig. 0 2 : Un aperçu des interactions entre métabolisme primaire et secondaire (156).

➔ **Biosynthèse des essences** : La cellule végétale est capable de coordonner les multiples réactions biochimiques conduisant à l'élaboration des essences, ces réactions sont assumées par une machinerie compliquée et faisant appel à quelques-unes des fonctions essentielles dans la vie des plantes (photosynthèse, respiration, etc.) (34).

Les 5 schémas principaux de la biogenèse des constituants des huiles essentielles :

1. La relation structurale entre les constituants des huiles essentielles et les acides aminés et acides gras constituants de la matière vivante (34) :

- ➔ Formation des **méthylcétones aliphatiques** par β - Oxydation des acides gras;
- ➔ Formation des **aldéhydes gras aliphatiques** (Propanal ou Isopentanal) à partir des acides aminés (valine ou leucine) (**Théorie de Pollak**) ;
- ➔ Formation de **l'indole et l'antranilate de méthyle** (Constituants de HE de fleurs d'oranger amer) à partir de Tryptophane.

2.

- ➔ Formation des **aldéhydes monoéthyléniques et polyéthyléniques** à partir des acides gras insaturés en C 18 ;
- ➔ Formation de **(Z) hexène-3 al-1, (E) hexène-2 al-1 et hexanal** à partir des Lipides par la lipoxigénase

Sous l'action de **NADH⁺ oxydoréductase**, ces aldéhydes sont transformés en **alcools correspondants**.

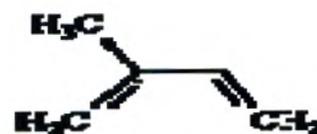
3. La biosynthèse des isoprénoïdes :

Les composés terpéniques sont issus d'une voie métabolique secondaire de **l'acide mévalonique (67)**.

L'isoprène est le point de départ de la biosynthèse des terpènes (8).

L'acide mévalonique à 6C qui est formé par la condensation de 3 unités d'acétate, est convertis en Isopentényl pyrophosphate IPP à 5C et ensuite en Diméthyl allyl pyrophosphate DMAPP qui sont les unités actives en 5C de l'Isoprène.

L'IPP et le DMAPP sont ensuite combinés à un rapport de 1 :1 molaire pour engendrer le Géranyl pyrophosphate GPP à 10C qui est le précurseur des monoterpènes. L'addition de IPP à GPP produit le Farnesyl pyrophosphate FPP à 15C qui est le précurseur des sesquiterpènes (100).



L'isoprène

Les autres précurseurs intermédiaires sont **(34)** ; **(78)** :

- Le squalène (condensation de 2 unités FPP) pour les triterpènes et les stérols ;
- Le Géranyl- géranyl pyrophosphate GGPP (condensation de 2 unités GPP) pour les caroténoïdes **(34)**.

Dans la recherche sur la genèse des composés terpéniques dans les végétaux, on a établi que les esters (leur formation dans les plantes est due à l'action d'un acide sur un alcool terpénique) prennent naissance dans les parties vertes, c'est-à-dire dans les parties soumises à l'action chlorophyllienne. Par exemple, les feuilles donnent des essences plus riches en carbures et en esters que les fleurs et dans ces dernières où la respiration l'emporte sur l'assimilation chlorophyllienne, les alcools se convertissent en aldéhydes et en cétones par oxydation **(158)**.

3. La biogenèse des composés aromatiques naturels : elle se fait selon la « règle polyacétique » de Birch faisant appel à des unités d' « acétate actif » **(34)**.

4. La biogenèse des phenylpropanoïdes C6-C3 : Les dérivés du phénylpropane sont des arènes issues d'une voie métabolique secondaire dite de l'**acide shikimique** lui-même intermédiaire de la synthèse de la lignine à partir du phénylpropane **(67)**.

Ce cinquième schéma explique la formation de la phénylalanine, de la tyrosine, de l'acide cinnamique et de ses dérivés chez le végétal **(34)**.

III. Isolation, caractérisation et évaluation des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires, généralement de 1-3% de la masse de la plante déshydratée, ont des structures très complexes, ce qui rend leur extraction et purification difficile (44).

Méthodes		Utilisées pour	
Extraction et Isolation	<ul style="list-style-type: none"> Le choix de la méthode dépend de la texture de la plante et sa teneur en eau ainsi que de type de la substance à isoler. 		
	<ul style="list-style-type: none"> Peut être effectuée par l'utilisation des solvants de polarité différente 	<ul style="list-style-type: none"> Lipides et terpénoïdes Composés polaires 	
Séparation	Chromatographies <ul style="list-style-type: none"> Le choix de la technique dépend des propriétés de solubilité et volatilité de composé à séparer 	C. sur papier	<ul style="list-style-type: none"> Composés hydrosolubles (carbohydrates, acides aminés, acides organiques et les composés phénoliques)
		CCM	<ul style="list-style-type: none"> Composés liposolubles (lipides, stéroïdes, caroténoïdes, quinones simples, chlorophylles)
		C. gaz liquide CGL	<ul style="list-style-type: none"> Composés volatiles (mono- et sesquiterpène)
		HPLC	<ul style="list-style-type: none"> Composés moins volatiles
	Electrophorèse	<ul style="list-style-type: none"> Composés chargés (acides aminés, quelques alcaloïdes, acides organiques et protéines) 	
Identification	Spectrometrie UV, Infra- rouge, spectrométrie de masse (SM), résonance magnétique nucléaire (RMN)		

Tableau 02 : Méthodes d'extraction, isolation, séparation et identification des métabolites secondaires (78).

IV. Fonctions des métabolites secondaires :

Chez les dicotylédones, la grande majorité des défenses chimiques provient du métabolisme secondaire (161).

Les principales fonctions des métabolites secondaires chez les végétaux :

- ❖ La pigmentation ;
- ❖ L'action antiherbivore (insectes/mammifères) ;
- ❖ Les propriétés antifongiques et antibactériennes ;
- ❖ La signalisation chimique (symbiose) ;
- ❖ Ce sont des substances de croissances (160).

V. Application des produits phytothérapeutiques :

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. Parmi les milliers de molécules produites par ce métabolisme, l'homme sélectionne celles qui lui permettent de se défendre contre les agressions d'autres organismes vivants pathogènes et de corriger ses troubles métaboliques **(63)**.

On entend par phytothérapie le traitement curatif ou préventif des maladies et des troubles subjectifs par l'utilisation de préparations obtenues à partir de plantes entières ou d'organes de plantes. Les plantes ainsi employées sont communément appelées **plantes médicinales (62)**.

Selon la réglementation française et d'après la circulaire n°346 du 02/07/79 du code de la santé publique : une plante médicinale est une plante présentant des propriétés médicamenteuses, sans avoir ni ne pouvant avoir aucune utilisation alimentaire, condimentaire et hygiénique; pour les plantes présentant des propriétés autres que des propriétés médicamenteuses, elles sont considérées comme des plantes aromatiques condimentaires **(157)**.

La phytothérapie est la quatrième branche de la connaissance des plantes médicinales, vaste ensemble qui comprend aussi la phytochimie, la phytopharmacie et la phytopharmacologie. Elle décrit les possibilités et les limites de l'application des produits phytothérapeutiques aux indications de la médecine humaine. Il faut que ces produits satisfassent aux exigences de la législation sur les médicaments en ce qui concerne la qualité, l'efficacité et l'innocuité. A ce sujet, le mode de préparation de drogues joue un rôle fondamental puisque les plantes médicinales ne sont presque jamais utilisées à l'état brut, exception faite des applications de feuilles de choux ou de tranches d'oignons **(154)**.

De la récolte et de la conservation des plantes dépend leur action. Il est essentiel qu'elles conservent le maximum de leurs principes actifs **(154)**, car plus une préparation phytothérapeutiques contient de principes plus ses indications thérapeutiques sont nombreuses et son action générale **(62)**.

■ Récolte et conservation des plantes : (154) ; (97)*

La négligence des données suivantes a contribué, pour beaucoup, à faire tomber les plantes, à plusieurs reprises, dans le discrédit (154).

Parties de la plante	cueillette	Séchage	Conservation
Racines		A l'air sec	A l'abri de l'humidité
Racines charnues		A l'étuve	
Racines mucilagineuses		Au four	
Racines vivaces	Au printemps		
Racines des plantes annuelles et bisannuelles	En automne		
Ecorce des plantes annuelles et bisannuelles	Quand il a acquis une certaine épaisseur et se sépare facilement du corps		
Ecorce d'arbre	En hiver		
Ecorce d'arbrisseau	En automne		
Ecorce de résineux	En printemps	Au soleil ou à l'étuve	
Bois			
Fleurs	Au début de leur épanouissement* Les fleurs de rose se cueillent en boutons	A l'ombre et à atmosphère sèche	
Feuilles	Avant la floraison*		
Semences	Quand la plante se dessèche*	Au soleil ou dans une serre à 30-35°C	
Tiges	En même temps que les feuilles		
Feuilles épaisses			
Bourgeons	Au début du printemps*		
Fruits	Un peu avant complète maturité		

Tableau 03 : Récolte, séchage et conservation des plantes

■ **Propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires :**

A travers les temps, les civilisations et les régions du globe, découvrons l'histoire des plantes et des huiles essentielles (75).

Les métabolites secondaires sont recherchés parce qu'ils sont reconnus pour leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques, gastro-intestinales, antioxydantes...

Face au problème soulevé depuis plusieurs années par la résistance des bactéries, la seule alternative fiable à l'usage des antibiotiques semble être celle des huiles essentielles. Connue de façon empirique depuis des siècles, leur efficacité anti-infectieuse a été scientifiquement démontrée *in vitro* et *in vivo* (51).

Parmi les terpènes se retrouve le médicament anticancéreux puissant **taxol**, un diterpène de l'if occidental et le triterpène **digitaline** du digitale, utilisé comme médicament efficace contre l'insuffisance cardiaque.

La **phytoalexine** populaire, Resvératrol, un agent anticancéreux, est un exemple de composés phénoliques, comme le sont les flavonoïdes et les tanins qui ont des activités antimicrobienne, antivirale et hypoglycémiant, alors que les coumarines et les anthocyanosides ont des propriétés anti-œdémateuses.

Les alcaloïdes donnent des effets pharmacologiques puissants chez les animaux en raison de leur capacité de pénétrer les membranes cellulaires. **La nicotine**, un alcaloïde disponible commercialement, est un stimulant pour le système nerveux central et un diurétique doux. **La morphine** est l'analgésique le plus abondant et le plus puissant (44).

On notera aussi l'existence d'anesthésiques locaux (**cocaïne**), d'antifibrillants (**quinidine**), d'antitumoraux (**vinblastine**), d'antipaludique (**quinine**) et d'amœbicides (**émitine**) (27).

■ **Les effets secondaires :**

On entend souvent dire au sujet des produits de santé phytothérapeutiques qu'ils « ne peuvent pas faire de mal » (62).

Malgré les preuves de plus en plus nombreuses, de l'efficacité des plantes, il se trouve encore des détracteurs de la phytothérapie. Leurs arguments ne sont pas toujours sans valeur. Ils disent en substance que la phytothérapie n'est pas assez précise, qu'on n'est pas sûr de la qualité des plantes dont la récolte et la conservation exigent les plus grands soins. Mieux valent, pour eux, les produits de synthèse, « chimiquement purs », définis et dosés.

En face des détracteurs, se trouvent des esprits libéraux, bienveillants. Pour eux, la phytothérapie n'est pas une mauvaise chose « loin de là », car elle a au moins le mérite, si elle ne fait pas de bien, de ne pas faire de mal.

Une autre catégorie d'interlocuteurs reconnaît loyalement les pouvoirs de la phytothérapie. Mais pour eux, malheureusement, elle est lente à agir (154).

En ce qui concerne les effets secondaires, les phytomédicaments se distinguent des médicaments chimiques de synthèse par la fréquence et l'intensité, mais pas fondamentalement. Les phytomédicaments sont mieux tolérés que les médicaments synthétiques, dont le potentiel d'effets secondaires est considérable. L'explication paraît simple : la plante et l'homme ayant connu une longue évolution commune, le métabolisme a eu beaucoup plus de temps pour s'adapter aux substances naturelles que ce n'a été le cas pour les molécules synthétiques, dont certaines sont très récentes (62).

Généralement, les végétaux (les plantes toxiques évidemment mises à part) ne présentent pas de caractère de gravité mais n'en existent pas moins. Leur particularité est de ne pas provoquer d'effets secondaires irréversibles (154).

Plusieurs expériences ont permis de conclure à la mutagénicité ou cancérogénicité potentielle de plusieurs plantes médicinales, les inquiétudes portant principalement sur les alcaloïdes pyrrolizidiniques, les anthraquinones et la quercétine. Les arguments avancés sont toutefois contestables. Il a, par exemple, d'ores et déjà été répondu par la négative à la question de la transposabilité à l'homme des essais sur l'animal ou de certains lignages cellulaires. Les réactions de l'animal sont beaucoup plus tributaires de l'espèce, et certains animaux sont même élevés dans la consanguinité afin de réagir de manière invariable (rat Wistar).

En plus, la plupart des essais sur l'animal ont été effectués dans des conditions de dosage thérapeutique très différentes de celle de l'utilisation humaine. A cela s'ajoute le caractère complètement anormal des conditions dans lesquelles sont nourris ces animaux, à qui l'on administre par sonde œsophagienne pendant des mois, voire des années, la substance étudiée. Ils se trouvent de ce fait dans une situation artificielle qui, à elle seule, est susceptible de provoquer des altérations organiques pathologiques.

Enfin, un autre argument pèse lourdement dans la balance, à savoir qu'il n'existe pas de données toxicologiques humaines ni d'études épidémiologiques correspondantes pour pallier ce manque.

Les réactions allergiques font aussi partie des effets secondaires classiques des phytomédicaments.

Il est donc incontestable que les produits phytothérapeutiques possèdent un potentiel important d'effets indésirables, mais, du fait de son caractère essentiellement hypothétique ou paradigmatique, la toxicologie est peu révélatrice en ce qui les concerne. Cela vaut d'ailleurs également dans une certaine mesure pour les médicaments synthétiques et autres substances de notre environnement (62).

Les Huiles Essentielles

Les essences parfumées connues dès l'origine des civilisations, furent d'abord utilisées à des usages sacrés. Rites funéraires, embaumement des morts, onctions des élus, sacrifices aromatiques aux ancêtres et aux divinités apparaissent comme une constante de mondes antiques, de la Chine à la Perse et de l'Arabie à la Grèce (21). Parallèlement, on retrouve l'utilisation de végétaux dans les pratiques thérapeutiques de ces diverses civilisations, selon différents stades évolutifs liés à leur utilisation (64).

I. Définition, localisation et répartition botanique :

La norme A.F.N.O.R. NF T75-006 (Février 1998) eqv. I.S.O. 9235 (1997), a donné la définition suivante d'une huile essentielle : «**Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de Citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention ; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition.**»

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Parmi les espèces végétales (800 000 à 1 500 000 selon les botanistes) 10 % seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique par l'intermédiaire des cellules ou des organes particuliers où elles restent localisées ; ces structures histologiques spécialisées sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante (27), et elles sont variables suivant les familles botaniques :

- Poils sécréteurs externes (Labiées, Géraniacées);
- Cellules sécrétrices (Lauracées, Magnoliacées, Pipéracées);
- Poches sécrétrices schizogènes (Myrtacées) ou schizolysigènes (Aurantiacées);
- Canaux sécréteurs (Ombellifères, Conifères) (27) ; (158).

Dans la plante, les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes :

Fleurs (organ Ylang-ylang, Rose, Lavande), **feuilles** (citronnelle, eucalyptus), **écorces** (cannelier), **bois** (bois de rose, santal, Cèdre), **racines** (vétiver), **rhizomes** (acore, Gingembre), **fruits** (badiane, Orange), **bulbe** (Ail), **Tige** (Petits grains), **bourgeon** (Pin), **sève** (Encens, Myrrhe), ou **graines** (carvi, Muscade, Anis) (26) ; (128).

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation (27).

II. Teneurs :

Quantitativement les teneurs en huiles essentielles sont plutôt faibles, inférieures à 10 ml/Kg. Des teneurs fortes comme celles du bouton floral de giroflier, 150 ml/Kg et plus dans la drogue sèche, sont exceptionnelles (27).

On sait en effet que les plantes aromatiques perdent peu à peu leur huile essentielle en raison d'une évaporation et ce, d'autant plus facilement quelles sont finement incisées (163). La fabrication de mélanges d'épices en poudres, est source de pertes d'arômes importantes fonction bien souvent du type de broyeur utilisé. Pour minimiser ces pertes, il est préférable de réaliser un broyage cryogénique sous azote pendant lequel la température de l'épice reste inférieure à -70°C réduisant presque à néant les pertes en arômes et en eau (135).

III. Procédés d'extraction des huiles essentielles :

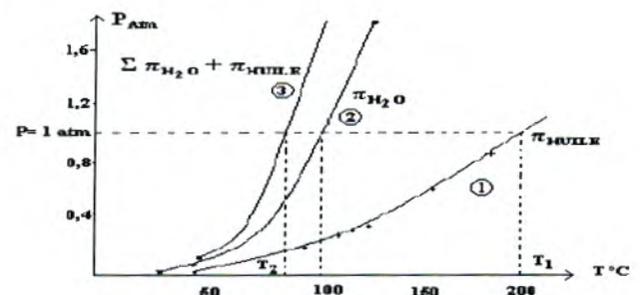
La recherche de moyens d'extraire les principes odorants aboutit à l'invention de la distillation en Perse, entre 5 000 ans, découverte du premier alambic en terre cuite, et 1 000 ans avant notre ère. Le terme d'huile essentielle, encore utilisé de nos jours est lié au développement et au perfectionnement de ce procédé (128) qui est basé sur la différence de composition entre un liquide et la vapeur engendrée (138).

Les huiles essentielles sont parfois appelées essences, dénomination à proprement parler incorrecte. L'essence est le produit de la plante et devient huile essentielle seulement après distillation, qui est la seule méthode donnant de vraies huiles essentielles.

Les huiles essentielles qui sont extraites par simple expression (agrumes) sont encore sous forme d'essence lorsqu'on les utilise. Les autres comme les huiles florales obtenues à partir du jasmin, du néroli ou de la rose, ne sont ni des essences, ni des huiles essentielles, mais des absolues (45).

Les huiles essentielles produites par **hydrodistillation, entraînement à la vapeur ou expression de l'écorce des fruits**, sont les produits les plus concentrés en composés olfactifs (151).

Le mélange eau/huile essentielle distillée par entraînement à la vapeur possède une température d'ébullition inférieure à 100°C à pression atmosphérique (généralement proche de 100°C en raison de la faible tension des constituants odorants) alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées (109).



Evolution des températures de distillation de l'eau et l'huile essentielle, et du mélange eau/huile essentielle en fonction de la pression du milieu (109).

Les Procédés d'extraction		
Distillation	Hydrodistillation simple	<ul style="list-style-type: none"> • Immersion directe du matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. • La composition chimique dépend largement de l'influence des conditions d'hydrodistillation sur l'essence contenue dans la plante (22).
	Hydrodistillation par micro- onde sous vides	Plante chauffée sélectivement par un rayonnement micro-onde dans le but de réduire le temps d'extraction et d'obtenir un bon rendement (27) ; (93).
	Distillation Par entraînement à la vapeur d'eau	Dans une chaudière, l'eau est d'abord chauffée sur un feu de bois. La vapeur produite est acheminée vers un alambic qui contient la plante. En se diffusant dans la matière végétale, la vapeur capture les huiles essentielles volatiles. Ce mélange gazeux se condense ensuite dans un serpentin refroidi à l'eau. Il s'écoule finalement dans un séparateur qui permet de récupérer les huiles (53).
	Hydrodiffusion	<ul style="list-style-type: none"> • Pulsation de la vapeur d'eau de très faible pression à travers la masse végétale du haut vers le bas (27) ; • Le rendement est légèrement supérieur ; • La durée de la distillation est plus réduite (de 30 % environ) (158).
	Distillation sous vide à T° de 50°C	<ul style="list-style-type: none"> • Le temps de distillation est réduit (158).
	Distillation à haute pression et à haute T°	<ul style="list-style-type: none"> • Permet une extraction plus complète des produits volatils en un temps plus court et avec moins de vapeur. • Décomposition des portions les plus volatiles des huiles par la haute température et la haute pression (158).
	Distillation à la vapeur d'eau avec entraînement par huiles essentielles	Entraînement avec une ou plusieurs autres huiles essentielles ayant des propriétés voisines, ou bien des propriétés complémentaires, les composants du mélange agissant en synergie (158).
Expression	<ul style="list-style-type: none"> • Ne peut convenir que pour des écorces fraîches, très riches en essence. 	
Extraction par enfleurage	<ul style="list-style-type: none"> • C'est une extraction des essences des fleurs par contact avec une matière grasse (128). 	
Extraction par CO₂ liquide	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisation de dioxyde de carbone à l'état supercritique (Pc=72,9atm et T=31,3°C) (134) ; • Augmentation du rendement dans le cas de plantes peu riches en huiles essentielles ; • Le produit obtenu était olfactivement moins fin (158). 	
Extraction avec des solvants	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisée pour les composés non entraînés par la vapeur d'eau (135) et pour les fleurs dont les molécules sont trop fragiles (128) ; • Obtention des oléorésines renfermant les substances volatiles mais aussi triglycéridiques, les cires, les colorants de nature lipidique et les substances sapides (qui ont le goût) (135) ; • Les solvants organiques utilisés sont très dangereux aussi bien pour le manipulateur que pour celui qui absorbe les produits ainsi obtenus (112). • Le procédé d'extraction peut modifier la composition de l'huile essentielle (158). 	

Tableau 04 : Les procédés d'extraction des huiles essentielles.

IV. Propriétés physiques et organoleptiques des huiles essentielles :

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques :

Propriétés physiques et organoleptiques	
<p>Les huiles essentielles sont entraînaibles à la vapeur d'eau. (27) Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels (155).</p>	
Odeur	Très odorante Dépend souvent de l'altération que l'air leur fait subir (164) .
Couleur	incolores ou jaunes pâles (121) ; Il existe cependant quelques exceptions dont la majorité de ces huiles colorées sont des essences ou des absolues (Bergamote et absinthe : vertes, jasmin : brun- rougeâtre, Cannelle : rougeâtre, huile essentielle à azulène : Bleue) (45) ✓
Consistance	Généralement fluides mais il en est de solides (155) .
Solubilité	Solubles dans les solvants organiques usuels ; Liposolubles Très peu solubles dans l'eau (27) .
Densité	Inférieure à celle de l'eau (Varie de 0.759 à 0.99) (27) ; Quand le contraire a lieu, cela indique une plus forte proportion d'oxygène dans l'un des constituants (les huiles de sassafras, de girofle ou de cannelle) (164) .
Point d'ébullition	Varie entre 160° et 240°C (pour les essences formées d'un principe hydrocarboné et d'un principe oxygéné) (164) .
Indice de réfraction	Elevé (27) .
Indice de polarisation	La plupart dévient la lumière polarisée (Dextrogyre ou Lévoogyre) (27) .
Altération	Très altérables, sensibles à l'oxydation Elles ont tendance à se polymériser en donnant lieu à la formation de produits résineux (121) ; Par une longue exposition à l'air, elles s'épaississent, deviennent visqueuses et souvent acides (164) .
Conservation	Limitée (121) .

Tableau 05 : Propriétés physiques et organoleptiques des huiles essentielles

V. Composition des huiles essentielles :

Les composants des huiles essentielles sont génériquement dits « **aromatiques** » en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique, ce qui peut prêter à confusion **(128)**.

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des :

1. Mono- et sesquiterpènes qui constituent parfois **90%** de l'huile essentielle **(27)**, et qui sont à la base de leurs propriétés olfactives. De nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont également considérés comme des composés terpéniques **(67)**.

2. Composés aromatiques, qui sont néanmoins importants sur le plan qualitatif et quantitatif chez certaines huiles essentielles, telles que les essences d'anis, de cannelle, de girofle, etc... **(41)**.

* **Les dérivés du phényl propane C6-C3** sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. **(27)** ; on peut citer : *L'acide de l'aldéhyde cinnamique* ; *L'eugénol* ; *Le safrole* ; *L'anéthole* et *l'aldéhyde anisique*. **(121)**.

* On peut également rencontrer dans les huiles essentielles **des composés en C6-C1** comme *la vanilline* (assez fréquent) et comme *l'anthranilate de méthyle*.

* **Les lactones dérivées des acides cinnamiques** seront également présentes dans certaines huiles essentielles **(27)**.

3. Divers autres constituants minoritaires leurs sont associés (des acides organiques de faible poids moléculaire, des cétones de faible poids moléculaire, des coumarines volatiles) **(121)**.

Les dérivés phénylpropanoïques et les terpénoïdes sont associés en nombre et en proportions très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs où ils forment l'essence naturelle **(41)**.

VI. Classification des huiles essentielles :

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont à plusieurs composés majoritaires, c'est à dire composées d'une grande diversité de composés (entre 2 et 6 composés majoritaires, des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces).

La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné sur lequel sont souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents (sites oxygénés, groupes fonctionnels azotés ou soufrés) **(128)**.

Sous le rapport de leur composition élémentaire, on les rangeait en trois classes :

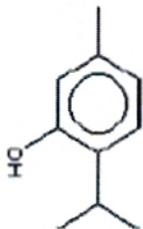
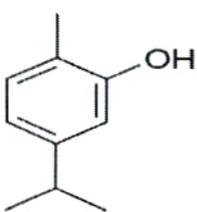
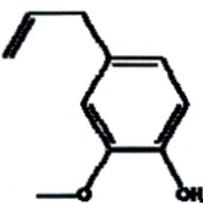
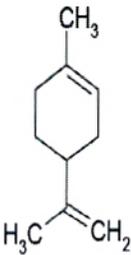
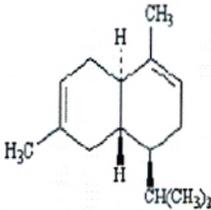
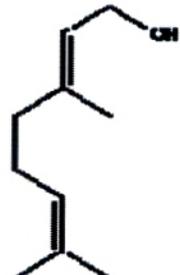
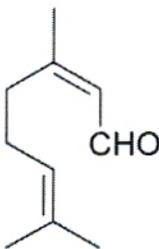
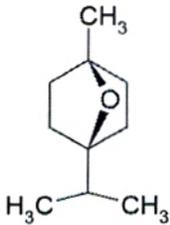
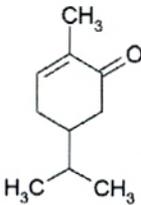
- Les essences hydrocarburées : riches en terpènes. Ce sont les plus nombreuses.
- Les essences oxygénées : Ce sont généralement toutes les essences solides.
- Les essences sulfurées : qui forment un groupe assez naturel mais il n'en est pas de même des autres **(164) ; (155)**.

En général, on a un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Dans certaines huiles essentielles, les hydrocarbures prédominent; dans d'autres, la majeure partie de l'essence est constituée de composés oxygénés qui donnent l'odeur et le goût des huiles essentielles. **(121) ; (155)**.

La structure de ces huiles varie en fonction **(65); (107) :**

- Du **nombre d'atomes de carbone** qui la constitue : Les monoterpènes **C10**, Les sesquiterpènes **C15** et plus rarement les diterpènes **C20**.
- Du caractère **saturé** ou **insaturé** des liaisons.
- De leur agencement : **linéaire** ou **cyclique**.
- De la **configuration spatiale** (forme de chaise, de bateau, de trièdre...).
- De la nature des **groupes fonctionnels** :
 - Terpènes** $R_1-HC=CH-R_2$: (pinène, camphène, cadinène, limonène) ;
 - Alcools terpéniques** $R-OH$ (linalol, géraniol, santalol.) ;
 - Cétones** R_1-CO-R_2 (thuyone, carvone);
 - Phénols** C_6H_6-OH (eugénol, carvacrol, thymol);
 - Aldéhydes** $R-CHO$ (aldéhyde cinnamique, citral) ;
 - Esters** $R_1-COO-R_2$ (acétate de linalyle, acétate de méthyle) ;
 - Ethers** R_1-O-R_2 (Anéthole, eucalyptol, cineol- 1, 8).

Structures chimiques de quelques composés extraits des huiles essentielles (81) ; (128) :

					
Thymol	Carvacrol	Eugénol	α- pinène	β- pinène	Limonène
					
β- myrcène	Cadinène	Géranol	Citral	Cinéol	Carvone

VII. Le Contrôle analytique et les facteurs de variabilité des huiles essentielles :

Selon la Pharmacopée française et européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais. Les déterminations analytiques les plus courantes se divisent en :

Les caractères organoleptiques	Aspect, odeur, couleur (8).	
Les caractéristiques physiques	Densité, indice de réfraction, variation polarimétrique, solubilité dans l'alcool, point d'ébullition, point de congélation (8).	
Les caractéristiques chimiques	Teneurs en certains constituants, indice d'acide, indice d'ester, indice de carbonyle, recherche de corps étrangers (8).	
Les caractéristiques chromatographiques et spectrophotométriques	Chromatographie sur couche mince CCM	Insuffisante (27).
	Chromatographie en phase gazeuse CPG	Évaluation qualitative et quantitative de la composition chimique (27).
	Chromatographie liquide haute pression HPLC	Peu intéressante pour les fractions volatiles, Efficace pour les HE de citrus de lavandes ou d'estragon (27).
	Couplage chromatographie et spectrométrie de masse (CG/SM et CL/SM)	Identification et quantification de chaque molécule ; Obtention de la composition précise des huiles essentielles (51).
	Spectrométrie UV	Dans le cas des HE d'agrumes (34)
	Résonance magnétique nucléaire RMN	Dans le cas des composés difficiles à séparer par CG et les molécules structuralement similaires (93).

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés pour les plantes cultivées (128).

L'utilisation de tels profils est indispensable pour différencier dans une même espèce les variations chimiques induites par différents facteurs qui ont une influence sur la biosynthèse végétale (128), tels que :

L'ensoleillement, l'altitude, la nature et la composition du sol (128) ;

La température, l'humidité relative, la durée totale d'insufflation et le régime du vent ;

Le cycle végétatif ;

Les procédés d'obtention : Il faut enfin signaler que la cinétique de la distillation n'est pas la même pour tous les constituants d'une huile essentielle, la composition du distillat varie en fonction du temps (27).

L'origine géographique de la plante ;

La partie de la plante, la culture et l'heure de la récolte :

Il ne faut pas récolter par temps couvert ou humide sous peine de nuire à la qualité ;

Afin de leur garantir une composition 100 % naturelle, les plantes choisies sont sauvages ou proviennent de cultures écologiques et biologiques. Seules les parties sécrétrices ou les plus concentrées de la plante sont récoltées à la période de rendement optimum : avant la floraison (Menthes), pendant (Romarin, Lavande) et après celle-ci (plantes à graines) ou encore après la rosée du matin (fleurs fragiles) (128).

La conservation des plantes et des huiles essentielles (158).

VIII. Traitements ultérieurs des huiles essentielles :

Les qualités organoleptiques des huiles essentielles sont surtout exploitées dans l'industrie des arômes alimentaires et de la parfumerie. Dans ces domaines, les essences sont souvent **modifiées, neutralisées, décolorées, rectifiées** pour éliminer certains produits indésirables potentiellement irritants, allergènes ou photosensibilisants (128).

IX. Fonction des huiles essentielles :

Certains auteurs ont voulu voir, dans les huiles essentielles, une ressource énergétique facilitant certaines réactions chimiques (8), d'autres, pensent qu'elles exerceraient une action antiseptique vis-à-vis de certains microorganismes (Champignons) et auraient donc un rôle protecteur (121).

Parmi les composants majoritaires des huiles essentielles, nous trouvons les terpénoïdes qui possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allélopathiques, c'est-à-dire inhibiteur de la germination, mais aussi lors des interactions végétal- animal, comme agent de protection contre les prédateurs tels que les insectes. Ils interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateurs (96).

L'utilité des huiles essentielles pour les plantes désertiques a été rattachée à la conservation d'une humidité indispensable à la vie des plantes exposées à des climats désertiques. Les vapeurs aromatiques ont pour propriété de saturer l'air autour de la plante empêchant le jour la température de l'air de monter jusqu'à un degré insupportable pour la vie végétale et la nuit de baisser de façon excessive. (8).

X. Activités biologiques de huiles essentielles :

Par leur richesse en terpènes et phénols, ainsi qu'en alcools et en aldéhydes, les essences naturels ont, depuis la découverte de leurs constituants, toujours été considérées comme devant obligatoirement être douées de propriétés antiseptiques. En effet, leur action bactéricide est établie depuis des millénaires (155).

Plusieurs composés sont souvent cités comme responsables des propriétés antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles : le thymol, le carvacrol, le cinnamaldéhyde, l'eugénol, le 1,8-cinéol, le camphre et les thujones (135).

En dehors des propriétés antiseptiques et antimicrobiennes largement utilisées à l'heure actuelle, les huiles essentielles possèdent des propriétés anti-toxiques, antivenimeuses, antivirus et une action énergétique puissante (155).

D'excellentes capacités à inhiber les réactions oxydatives ont été mises en évidence pour les huiles essentielles ou extraits de romarin, sauge, thym, origan, sarriette, clou de girofle, gingembre et curcuma (42). Mais parmi ces plantes, seul le romarin a été l'objet d'un développement industriel. De nombreux composés responsables du pouvoir antioxydant ont été identifiés. Ce sont surtout des phénols et polyphénols (135).

Les propriétés antiparasitaires des essences sont également connues depuis les temps les plus reculés. Les essences de lavande, de géranium, d'origan, ... éloignent les insectes, les mites, les moustiques, et leur application fait merveille dans le traitement des piqûres d'insectes, guêpes, moustiques, araignées (155).

Fonctions chimiques	Propriétés
Phénols (<i>Thymol, carvacrol, eugénol</i>)	Stimulantes, Toniques Antiseptiques, Bactéricides Fongicides, Anti-virale, Antiparasitaires, Irritantes, antioxydantes
Alcools terpéniques (<i>Géraniol, citronnelol</i>)	Anti- inflammatoire, Antiseptiques, Bactéricides, Fongicides, Anti-virale, Neurotoniques
Aldéhydes terpéniques (<i>Citronnellal, citral</i>)	Antifongiques, Sporicidas, Toxicité liée à la présence du groupe aldéhyde, Insecticide
Ethers- oxyde, peroxydes (Cinéol)	Antibactériens, Antifongiques, Insecticides
Cétones (<i>Carvone, camphre</i>)	Calmantes, Antivirales, Antifongiques, Neurotoxiques Anti-épileptique
Hydrocarbures monoterpéniques (<i>limonène</i>), sesquiterpènes	Fongistatique, Bactériostatique, Insecticides, Nematicide, Herbicide

Tableau 06 : Activités biologiques de molécules aromatiques selon leur fonction chimique (81).

Activité antimicrobienne des huiles essentielles :

Empiriquement reconnues depuis des siècles, la confirmation scientifique de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est récente. Elle ne date que du début du siècle dernier avec les travaux du **Dr Gattefossé**, le père de l'aromathérapie en France. Depuis ce temps, l'utilisation des huiles essentielles s'est développée jusqu'à devenir depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses **(128)**.

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des Labiatae : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles les plus actives **(3) ; (22)**.

L'activité des huiles essentielles est souvent assimilée à une activité bactériostatique. Cependant plusieurs études ont montré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des propriétés *bactéricides* **(30), (91), (94), (162)** et *fongicides* **(76)**.

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé car une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet **(80)**. C'est pour cela qu'il est important de mentionner la dénomination complète ainsi que le Gram des microorganismes ainsi que l'espèce botanique et le chémotype de l'huile essentielle.

La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram **(51)**, ou dépend des huiles essentielles utilisées **(47)**.

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre les composants.

La valeur d'une huile essentielle tient à son « **totum** », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires **(93)**.

Les composés chimiques de plus grande efficacité antibactérienne et à plus large spectre sont des **Phénols**, des **Aldéhydes**, des **Alcools** et des **Cétones** **(81) ; (155) ; (128)**. Pour les **terpènes** les avis divergent encore actuellement **(155)**.

Les groupes moléculaires avec les puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Des études fondamentales ont également montré que les alcools et les lactones sesquiterpéniques avaient une activité antifongique **(51)**.

Les **PHENOLS** (thymol, carvacrol et eugénol) sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane (128).

L'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (**p-n-propylphénol**>**thymol**>**isoeugénol**>**eugénol**). L'addition de groupements alkyl au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique (81).

Les **ALCOOLS** sont généralement plus connus pour leur activité létale que bactériostatique sur les cellules végétatives (51).

Les **ALDEHYDES** sont de puissants agents antimicrobiens (128). Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif contre les champignons (81).

Les **TERPENOÏDES** sont des molécules réputées actives, car les hydrocarbones saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et de leur faible solubilité (74).

Méthodes de détermination de l'activité :

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité anti-microbienne des huiles essentielles. L'insolubilité des huiles essentielles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une explication de la variété des techniques. Selon la souche microbienne, l'huile essentielle et l'application choisie, divers milieux de culture peuvent être mis en œuvre.

Les différents protocoles peuvent ainsi être classés :

1. selon le **milieu** dans lequel se fait la **diffusion** de l'huile essentielle, soit liquide, solide ou gazeux,
2. selon la nature du **contact** de l'huile essentielle avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant (128).

Technique de l'aromatogramme en milieu solide :

❖ **Méthode des cupules (Détermination qualitative de la bactériostase) :**

Il suffit de découper des cupules avec un emporte pièce de 1cm de diamètre, dans un milieu gélosé additionné de tween 80 à 10% coulé en boîte de Pétri de 9 à 10 cm et ensemencé suivant les méthodes classiques. Dans le fond de chaque cupule on disposera une goutte de milieu gélosé préalablement fondu au bain-marie bouillant pour éviter la diffusion de la solution sous la couche d'agar ; on laisse refroidir.

Dans chaque cupule on versera deux gouttes calibrées d'huile essentielle (8).

❖ **Aromatogramme ou méthode des disques (Détermination qualitative de la bactériostase) :**

« L'aromatogramme est à la Phytothérapie ce que l'antibiogramme décrit par la Pharmacopée française des antibiotiques est à la médecine » (8).

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri (Figure 03) (60). Cette méthode est la technique que nous avons utilisée pour évaluer dans un premier temps l'activité antimicrobienne des huiles essentielles étudiées.

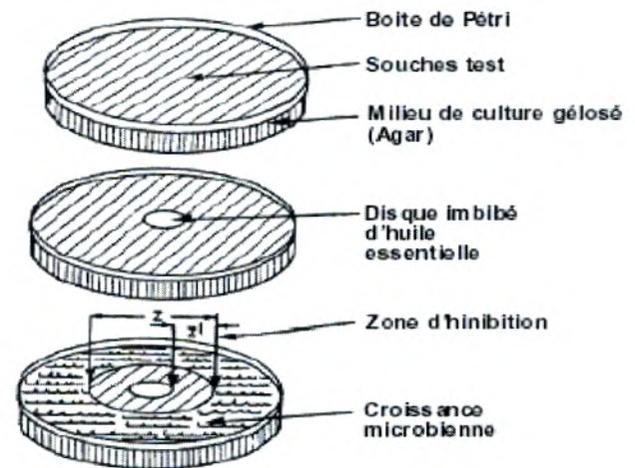


Figure 03 : Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri (165).

❖ **Méthode de contact direct (Détermination quantitative de la bactériostase) :**

C'est l'émulsion des huiles essentielles au sein de la gélose liquéfiée à 50°C, par l'intermédiaire de tween 80, inactif à des concentrations inférieures à 10 % (10) ; (17) ; (36).

❖ **Microatmosphères :**

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience (128). (Figure)

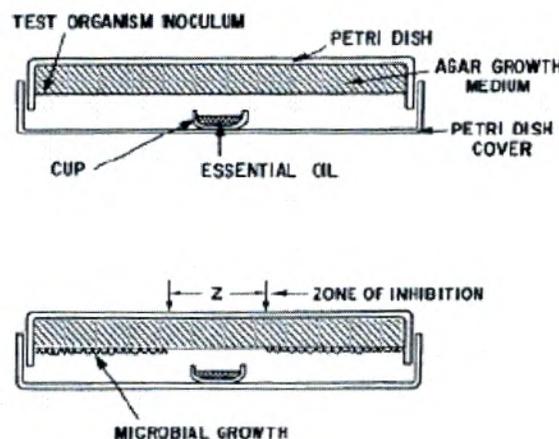


Figure 04 : Illustration de la méthode des microatmosphères (165)

Dans chacune des deux méthodes, Contact Direct et Aromatogramme par Cupules, du Tween 80 a été utilisé. C'est un agent dit émulsionnant qui va disperser l'huile dans l'eau, il doit être non ionique, inerte, dépourvu d'activité synergique antibiotique pour l'essence et chimiquement stable. Il semble que seul les tween 20 et 80 répondent à ces différents critères (8).

Technique de l'aromatogramme en milieu liquide :

❖ Détermination quantitative de la bactéricidie : technique de Mruzella

Rapporté par **Beylier Maurel (1976)**, cette technique permet d'évaluer le pouvoir antimicrobien en bouillon après solubilisation de l'huile essentielle dans l'éthanol à 95 %.

Mode d'action des huiles essentielles :

Les affections microbiennes correspondent, en gros, à un état alcalin, avec un potentiel d'oxydoréduction rH_2 assez faible et une résistivité également faible. Donc il paraît logique de leur opposer un traitement présentant des caractéristiques inverses, c'est à dire un traitement acide et oxydant.

D'une manière générale, les essences naturelles ont un P^H acide qui s'oppose à la pullulation microbienne et surtout une résistivité très importante qui s'oppose également à la diffusion de l'infection et des toxines. On comprend dès lors les propriétés bactéricides des essences naturelles.

Le potentiel d'oxydoréduction a des chiffres variables selon les essences, qui activent les oxydations ou les réduisent selon les cas.

Mais comme souvent, la pratique n'apparaît par toujours aussi simple que la théorie (155).

Plus spécifiquement, plusieurs études ont montré que :

- Il y a une apparition de fuites d'ions potassium K^+ de cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec du Tea-tree (*Melaleuca alternifolia*). Il s'agit de la toute première indication de dégâts irréversibles au niveau de la membrane.
- Des composés isolés tels le thymol et le carvacrol rendent la membrane des bactéries perméable, prémices de leur mort (79) ; (94).

Le thymol et l'eugénol sont capables d'induire une lyse cellulaire. L'utilisation d'un microscope électronique a permis de montrer que les huiles essentielles attaquaient en même temps les membranes et les parois cellulaires (133).

- Les alcools agissent en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (51).

Les travaux antérieurs :

Une étude a été réalisée par **Simeon M. et al** en **1976**, avait pour but de définir les propriétés de chacun des 6 chimiotypes de *Thymus vulgaris* Linnaeus sur de nombreuses bactéries, levures et champignons.

Cette étude permet d'envisager entre autre, les buts d'utilisation, mettant en application les propriétés antiseptiques de contact de ces chimiotypes, leur adjonction au titre de conservateurs dans les industries pharmaceutiques, alimentaires ou cosmétologiques.

Les tests bactériologiques réalisés ont montrés que tous les chimiotypes sont de bon antibactériens puisque :

- Leur action bactériostatique en 18h ne dépasse pas 2mg/ml à l'exception du *Pseudomonas* (2 à 8mg/ml) ;
- L'activité bactéricide en 24h se situe entre 0.3 et 3.3mg/ml quel que soit le chimiotype considéré, tout en mettant en première place les types à thymol et à carvacrol suivis de très près des types à géraniol et à linalol.

53 huiles essentielles ont été testées contre 5 micro-organismes (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*). Les meilleurs activités sont observées par les huiles essentielles riches en substances phénoliques, c'est le cas du *Thymus vulgaris* et *origanum sp.* , ces 2 huiles essentielles ont montrées une activités contre tous les micro-organismes à l'exception du *Pseudomonas aeruginosa* (85).

Deans S.G. et al (1987), ont testé 50 huiles essentielles pour leurs propriétés antibactériennes contre 25 genres de bactéries. L'huile essentielle du **Thym** est parmi les 10 huiles essentielles les plus inhibitrices, puisqu'elle a montré une activité contre 23 genres de bactéries. Tandis que l'huile essentielle de **Laurier** est parmi les 33 huiles essentielles qui ont inhibé au moins 10 genres parmi les 25 genres de bactéries étudiés.

En **1992**, **Tantaoui A. et al.** , ont déterminé l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de 4 plantes originaire du Maroc, contre certaines bactéries, moisissures et levures. Parmi ces huiles, il y avait celle de *Thymus broussonetii*, qui s'est avérée la plus antimicrobienne à cause de leur richesse en thymol et carvacrol. L'activité de cette huile essentielle est plus prononcée contre les champignons que les levures et les bactéries et pour tuer ces micro-organismes il faut 2 fois plus de l'huile essentielle du thym que pour inhiber leur croissance.

Des huiles essentielles provenant de plantes aromatiques siciliennes (4 Lamiacée « *Origanum onites*, *Thymus capitatus*, *origan* et *sauge* commerciales » et 1 Lauracée « *Laurus nobilis* »), ont été testées contres 8 bactéries et 5 champignons. Les propriétés bactéricides et bactériostatiques ont été également traitées.

Les huiles essentielles de *Origanum onites*, *Thymus capitatus* et d'origan commerciale ont montré, dans cet ordre, une activité maximale à la fois antibactérienne et antifongique ; tandis que celles provenant de la sauge et de *Laurus nobilis* étaient quasi inactives. En comparant ces résultats avec la composition des huiles essentielles, il apparaît que ces activités sont dues principalement à la présence des composés phénoliques (20).

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est parmi 11 huiles essentielles extraites de plantes aromatiques originaires du nord de l'Italie et qui ont été étudiées pour leurs activités antibactériennes contre 25 micro-organismes. Cette huile a montré une grande activité inhibitrice de la croissance de tous les micro-organismes testés et cela est dû probablement à la haute teneur en phénols (thymol et carvacrol respectivement) (129).

Les extraits acqueux et méthanoliques des saponines, résines et huiles essentielles de *Thymus capitatus* originaire de l'Egypte ont montré une activité inhibitrice de la croissance de plusieurs bactéries et champignons (89).

Le pouvoir antifongistatique en milieu liquide de 24 huiles essentielles a été mis en évidence en présence de 6 champignons phytopathogènes. Ces huiles proviennent des plantes commerciales originaires d'Espagne. *Thymus vulgaris* est parmi les plantes étudiées. A une concentration de 500ppm d'huile essentielle du thym, de nombreux tests présentent 100% de fongistatie, tandis qu'à 100ppm, le pourcentage moyen d'inhibition était de 78.2% pour toutes les souches testées.

Le pouvoir bactériostatique et fongistatique de ces huiles essentielles a été mis en évidence par une technique d'émulsion en milieu solide en présence de 16 micro-organismes (bactéries, levures et moisissures). L'huile essentielle du thym présente une activité importante et très régulière par rapport à d'autres huiles (23) ; (24).

Les huiles essentielles d'origan (*Origanum vulgare*) et du thym (*Coridothymus capitatus*) ont été testées par fumigation contre 3 espèces d'*Aspergillus* et contre la microflore des graines de blé. L'huile essentielle du thym était moins efficace contre les mycéliums et ils ont observé une croissance même à une concentration de 4µl/l. Cependant elle a été fongistatique contre les spores (CMI= 3µl/l) (122).

En terme d'activité antibactérienne, c'est le linalol qui s'est montré le plus efficace et a inhibé 17 bactéries. Il était suivi par le cinéol et le géraniol (chacun d'eux inhibant 16 bactéries), puis par le menthol et le citral qui ont inhibé respectivement 15 et 14 bactéries. Contre les champignons, le citral et le géraniol étaient les plus efficaces (inhibant les 12 champignons), suivis par le linalol (inhibait 10 champignons) puis par le cinéol et le menthol qui en inhibaient 7 (123).

L'huile essentielle du thym est parmi les 105 huiles essentielles commerciales étudiées contre 25 espèces de bactéries, 20 souches de *Listeria monocytogenes* et 3 champignons filamenteux. Dans cette étude 3 variétés du thym ont été étudiées : le thym rouge, le thym rouge d'Espagne qui ont la même composition et le thym doux qui a une composition différente. Ces huiles ont été efficaces contre les bactéries et quelques champignons surtout pour les 2 variétés du thym rouge. Les résultats montrent quelques relations entre le composé majoritaire et l'activité biologique et une corrélation négative entre la teneur en 1,8 cinéol et l'activité antifongique :

- Les huiles qui ont montré une activité antimicrobienne élevée sont celles qui contiennent le cinnamaldehyde, l'eugénol et le citral comme constituants principaux. Ce résultat est comparable avec celui obtenu par **Moleyar et Narasimhau** qui ont étudié seulement l'activité antifongique.
- De même, les huiles essentielles ayant une teneur élevée en hydrocarbures monoterpéniques sont très actives contre les bactéries et non pas contre les champignons **(103)**.

Une étude a investigué l'activité de 52 huiles essentielles et extraits de plantes sur un large éventail de bactéries à Gram + et – ainsi que sur des levures et, entre autres, sur *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiellia pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* et *Serratia marcescens*. Les résultats ont été positifs et ont mis en évidence, pour la plupart d'entre elles, un pouvoir inhibiteur. En particulier, les huiles essentielles de lemongrass, d'origan et de **laurier** ont exercé un effet inhibiteur sur tous les organismes **(167)**.

Une étude a examiné les activités anti-bactériennes des huiles essentielles de poivre noir, de clou de girofle, de géranium, de noix de muscade, d'origan et de thym contre 25 bactéries de genres différents. L'objectif était également de tenter de déterminer les composants présents dans les huiles essentielles susceptibles d'être responsable de leur activité antibactérienne. Les résultats ont confirmé ceux de travaux antérieurs et mis en valeur l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles. Les composants avec des structures phénoliques comme le carvacrol, l'eugénol et le thymol étaient fortement actifs contre les microorganismes testés.

Dans cette étude, les alcools terpénoïdes ont montré une activité contre les microorganismes testés et agissaient comme des agents dénaturant les protéines ou des agents déshydratants. **(51)**.

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de 5 plantes aromatiques originaires du Cameroun contre les souches de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*, réalisée par **Nguefack J. et al (2001)** a montré que l'huile essentielle de ***thymus vulgaris*** avait une grande activité contre ces souches et que l'effet antibactérien de ces huile contre *Listeria innocua* est dû à la perméabilité de la membrane cytoplasmique de cette bactérie. Les effets antifongiques des huiles essentielles de ces même plantes ont été étudiés contre 3 champignons provenant des aliments endommagés et produisant de mycotoxine (*Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* et *A. fumigatus*). L'huile essentielle de ***thymus vulgaris*** était parmi les 3 huiles les plus efficaces en inhibant la croissance des 3 champignons à une concentration de 1000ppm. Cela veut dire qu'il est possible d'utiliser ces huiles essentielles comme des conservateurs alimentaires **(114)**.

12 huiles essentielles de plantes médicinales ont été testées pour leurs activités inhibitrices contre *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* et *Fusarium moniliforme*. Les résultats montrent qu'une concentration inférieure à 500ppm d'huile de ***thymus vulgaris*** a inhibé complètement tous les champignons testés et qu'elle a plus d'effet sur le développement fongique et par la suite sur la production de mycotoxines dans les graines de blé **(146)**.

Selon **Packiyasothy E.V. et al (2002)**, l'huile essentielle du **thym** est parmi 5 huiles essentielles qui ont montré une activité contre *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, et *Aspergillus flavus*.

Les propriétés antibactériennes de cinq huiles essentielles ont été évaluées et quantifiées sur une souche non toxigénique d'*Escherichia coli*. L'origan et le **thym** avaient les propriétés bactériostatiques et bactéricides les plus fortes, suivis par le **laurier** et le clou de girofle. In vitro, l'origan et le thym possèdent des propriétés colicides et colistatiques significatives. Les huiles essentielles de clou de girofle et de laurier sont moins actives (**28**).

L'huile essentielle du thym est parmi 10 huiles essentielles testées par 2 méthodes différentes contre 5 genres de champignons. Les résultats montrent que la méthode utilisée influe sur l'effet inhibiteur de huiles essentielles (**148**).

Une étude a montré que les huiles essentielles de 2 variétés du thym (***Thymus eriocalyx*** et ***T. xporlock***) ont un grand pouvoir fongicide contre *Aspergillus parasiticus* et inhibiteur de la production de l'aflatoxine (**132**).

Les huiles essentielles de ***Thymus capitatus***, ***Ocimum basilicum***, ***Myrtus communis*** et ***Laurus nobilis*** originaires de la Tunisie ont été testées contre 2 bactéries (*Lactobacillus plantarum* et *E. coli*) et un champignon (*Geotrichum candidum*). Les résultats montrent que les huiles de *Thymus capitatus* et *Ocimum basilicum* sont les plus inhibitrices de toutes les souches testées et que *E. coli* est plus inhibée que *Lactobacillus plantarum* par toutes les huiles étudiées (**169**).

Sayyah M. et al (2003), ont testé l'huile essentielle de ***Laurus nobilis*** sur des rats et des souris, et ils ont trouvé qu'elle a des effets analgésique, anti-inflammatoire et sédatif comparables à ceux des drogues non stéroïdiennes de référence : la morphine et piroxicam.

L'activité antifongique de 4 huiles essentielles de Lauracées a été étudiée contre 17 micromycètes :

Huile essentielle de	Composé majoritaire
<i>Aniba rosaeodora</i>	Linalol
<i>Laurus nobilis</i>	1.8- cinéol
<i>Sassafras albidum</i>	Safrol
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Trans-cinnamaldéhyde

Les résultats montrent que l'huile de *Cinnamomum zeylanicum* a la plus grande activité antifongique (**173**).

6 chimiotypes de ***Thymus vulgaris*** sont parmi plusieurs huiles essentielles étudiées pour leur effet antifongique contre *Candida albicans*. L'huile essentielle de ***Thymus vulgaris*** à Thymol était la plus efficace avec une CMI_{80%}=0.016µl/ml et sa présence dans le milieu de culture avec l'amphotéricine B entraîne une diminution de la CMI_{80%} de l'amphoB. La combinaison entre cette dernière et une faible concentration de cette huile avait un effet antagoniste. Ces résultats signifient que cette huile essentielle rend l'action antifongique de l'amphoB puissante (**172**).

L'activité insecticide des huiles essentielles contre les larves de moustique *Culex pipiens molestus* Forskal a été déterminée. L'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* Mill était la plus toxique avec une CL50= 24.5 mg/l, alors que la CL50 de l'huile de *Laurus nobilis* était de 117 mg/l. plus de 20 constituants majeurs de ces huiles essentielles ont été identifiés, 9 d'entre eux ont été étudiés pour leurs effets repoussant contre ces moustiques. Le terpinéol et le 1.8- cinéol étaient les plus efficaces (174).

L'activité antioxydante du **Thym et de thymol** a été étudiée dans le but de les utiliser pour la conservation alimentaire. Les résultats montrent que le thymol est un agent antioxydant et anti-inflammatoire potentiel dans les cellules humaines. Ce résultat est en rapport avec la nature chimique de ce composé, c'est un composé phénolique avec des propriétés redox et il joue un rôle important dans l'absorption et la neutralisation des radicaux libres et de peroxy-nitrite et la décomposition des peroxydes (171).

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymu fontanesii* originaire de l'Algérie (Djelfa) a été étudiée par la méthode des disques et la méthode des dilutions pour la détermination de la CMI. Cette huile a montré une grande activité inhibitrice contre les bactéries gram négatif et une activité antifongique dont l'activité maximale était contre le mucor « *Ramariamus* » avec une CMI de 0.2µl/ml (49).

XI. Applications thérapeutiques :

Les applications thérapeutiques des huiles essentielles sont vastes. Elles requièrent de bonnes connaissances de ces substances et du fonctionnement du corps humain (128).

Les huiles essentielles sont des extraits de plantes extrêmement concentrés et des thérapeutiques puissantes dont il ne faut pas abuser. Une goutte d'huile essentielle représente au moins 28 g de plante. Elles contiennent des principes actifs à des concentrations moyennes de 73 à 100 fois supérieures à celles de la plante aromatique dont elles sont extraites, et parfois même beaucoup plus (99). Donc, elles doivent être diluées dans une substance adéquate dans toutes les formes d'utilisation, interne ou externe, mais elles ne se mélangent pas à l'eau ou à un liquide aqueux à cause de leur consistance huileuse (158).

Il convient d'être très exigeant sur la qualité des huiles essentielles utilisées en thérapeutique et de demander des garanties (158). Pour rendre ce moyen thérapeutique plus fiable, il faudrait être assuré que les essences aient été conservées en petits flacons, toujours bien remplis et bien bouchés (155), dans des endroits frais car une température élevée peut oxyder intempestivement l'huile essentielle (6).

Certaines modifications chimiques interviennent au cours de la distillation, suite aux effets de la chaleur et du contact avec l'air et la vapeur, des modifications qui ne sont toutefois pas nuisibles et n'affectent pas les vertus thérapeutiques de l'essence. Dans un certain sens, elles semblent même légèrement les renforcer (45).

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanaliaires (125) ou au niveau de la microflore vaginale (159) et d'origine fongique contre les dermatophytes (31).

Leur utilisation ancienne, par voie générale pour leurs effets diurétiques, carminatifs, anti-inflammatoires et antalgiques est toujours valable. Les expérimentations animales ou tissulaires prouvent leur activité sur le système neurovégétative et le système endocrinien (55).

En plus, les huiles essentielles sont utilisées en cas de problèmes de circulation (douleurs menstruelles, circulation sanguine) et les jambes lourdes, l'amincissement, les problèmes respiratoires, les maux de têtes et l'insomnie, la fatigue et la déprime. Comme elles sont indiquées, en cas de problèmes digestifs, des aphrodisiaques (basse de vitalité sexuelle) et des problèmes dentaires ; certaines huiles essentielles favorisent la guérison des brûlures et ont une action locale cicatrisante et antalgique (1).

Craig (1999), a montré les propriétés hypocholestérolémiantes et le rôle protecteur contre le cancer des huiles essentielles.

Absorption et élimination des huiles essentielles :

Après une administration orale, pulmonaire ou dermique, les huiles essentielles diffusent rapidement au travers des membranes du corps et pénètrent profondément les tissus. Elles se répandent dans le système circulatoire et par là même dans tout le corps (1).

Ayant pénétré dans la circulation, les huiles essentielles vont être éliminées en l'état ou après transformation au niveau de l'intestin ou du foie. Dans certains cas, les substances absorbées peuvent se fixer dans les tissus, ce qui retarde leur élimination.

Les principaux émonctoires des huiles essentielles sont les voies respiratoires et la voie urinaire (sous forme de dérivés glycuronoconjugués) ; accessoirement la voie rectale, la salive, les larmes, le lait, les glandes sudoripares (8).

Effets secondaires des huiles essentielles :

La grande majorité des huiles essentielles ne sont pas toxiques et sont absolument sans danger lorsqu'elles sont utilisées de manière judicieuse, autrement dit , en petites quantités et aux faibles concentrations indiquées par des thérapeutes responsables. Toutefois certaines sont hautement toxiques, même en petites quantités, et d'autres peuvent le devenir si elles sont utilisées sur une longue période.

Il existe un groupe d'huile que l'on pourrait qualifier de « limite », car elles présentent certains risques et sont malgré tout assez aisément disponibles ; c'est peut-être pour ce groupe que la plus grande prudence est de rigueur.

Les huiles les plus toxiques, tout comme les huiles douteuses utilisées sur une trop longue période, ont généralement pour effet de détériorer les reins et/ou le foie **(45)**.

- ◇ *Toxicité par ingestion* : En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL50 supérieures à 5 g/kg. En ce qui concerne la Sarriette et l'Origan la toxicité est un peu plus élevée autour des 1.4 g/kg (données observées chez l'animal) **(27)**.
- ◇ *Toxicité dermique* : Le Thym, l'Origan, la Sarriette sont connues pour leur pouvoir irritant, l'Angélique et la Bergamote sont photosensibilisantes, la Cannelle est dermocaustique et allergisante pour les terrains sensibles **(128)**.
- ◇ *Toxicité selon la composition* : Certains auteurs **(66)** ; **(107)** se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent.

composés	toxicité
(Z)- anéthole, Thujones	Neurotoxiques
Apiole, Myristicine	Psychotropes
Asarones, safrole	cancérogènes
Bergaptène, xanthotoxine	mutagènes
Capsaïcine, Pipérine	inflammation
1,8- cinéole	Brûlure (gorge)
Cinnamaldéhyde	Allergie
Coumarines, psoralène	Phototoxiques
Estragole, Pulégone	hépatotoxiques

Tableau 07 : Quelques composés présentant une certaine toxicité (135)

- ◇ *Toxicité sur cellules animales ou humaines (cytotoxicité)* : Les huiles essentielles de Thym et de Lavande selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du Thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la Lavande **(84)**), sont cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois. Par ailleurs, des huiles essentielles de différentes variétés d'Origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines dérivées de cancers **(144)**.

Les Plantes Étudiées

I. Le laurier noble :

Laurier a connu son heure de gloire dans l'Antiquité où, symbolisant le dieu mythologique Apollon, il couronnait la tête des généraux vainqueurs, mais aussi des rois, des poètes et des étudiants en fin d'études. Les mots lauréats et baccalauréat ont leur origine dans le mot latin **laureatus** qui signifie couronné de laurier (139).

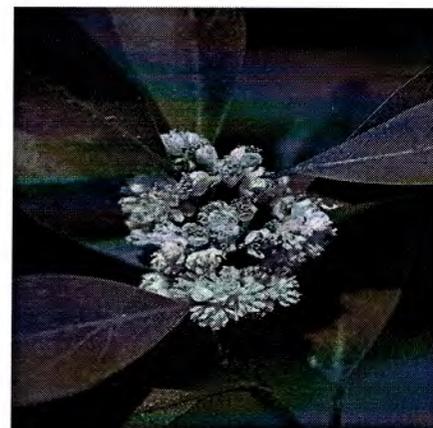
Synonymes : Laurier d'apollon, L commun, L sauce, L franc, L à jambon (106), L doux, L vrai, L méditerranéen (147).

Nom botanique : *Laurus nobilis* L (106).

All. : Lorbeerbaum (106); (139).

Angl. : Laurel, Bay laurel, Sweet bay (106); (139).

Noms vernaculaires : Rend, Round, Tasselt, Habb'ra'r (Le fruit) (106).



Systématiques (82) :

- ❖ Super- règne : Eucaryotes
- ❖ Règne : Plantae
- ❖ Classe : Angiospermae
- ❖ S/classe : Dicotyledoneae
- ❖ Sur- ordre : Magnoliidae
- ❖ Ordre : Laurales

- ❖ Famille : Lauraceae
- ❖ S/famille : Lauroïdeae
- ❖ Tribu : Laureae (Litseeae)
- ❖ S/tribu : Laurinae
- ❖ Genre : *Laurus*
- ❖ Espèce : *Laurus nobilis*

Description :

Arbre ou arbuste vivace, de 3 à 8 m de haut, il peut atteindre 18m dans les régions chaudes.

Feuilles vertes rougissant à la lumière, entières, de 8 à 12 cm de long, oblongues à lancéolées, persistantes, sub- coriaces. En coin à la base, atténuées et acuminées à l'Apex.

Les fleurs sont regroupées en petites ombelles. Enveloppe florale à 4 parties, plus au moins caduques, glabres, jaune- pâle différentes selon le sexe. Les fleurs mâles ont 8 à 12 étamines, les fleurs femelles ont 1 ovaire uniloculaire, un style et un stigmate.

Le fruit est une baie noire, ovoïde, rassemblant par sa forme et ses dimensions à une petite olive (106) ; (147) ; (139); (19).



Laurus nobilis L.
Image processed by Thomas Schoepke
www.plant-pictures.de

Biotope : arbre originaire d'Asie mineure, répandu sur le pourtour méditerranéen. Spontané dans tout le Tell Algérien, il est aussi cultivé (106) ; (139).

Odeur (106)	Très aromatique	
Saveur (106)	Acre, légèrement amère	
Composition (106) ; (139) ; (154) ; (130)	Essence, flavonoïdes, 25% de lipide (Baies) : acide laurique, acide oléique, acide palmitique, acide linoléique.	
Récolte (106)	Feuilles	Mars- Mai
	Baies	Été- automne
Parties utilisées (106)	Feuilles, fruits	
Propriétés (106) ; (154)	Digestif, antiseptique, balsamique, carminatif, béchique, stimulant, emménagogue, antispasmodique, expectorant, stomachique.	
Indications (106) ; (154)	Ballonnement, aigreurs, désinfection des plaies, rhumatisme, abcès, contusions, névralgies, règles douloureuses, sinusites, infections bucco-pharyngées, insomnies, fatigue....	
Effets secondaires (101) ; (59) ; (87) ; (119)	Asthme, dermatite, eczéma, érythème, œdème	

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* :

Rendement (139)	0.5 à 4% (Feuilles : 0.5- 2%, Fruits : 2- 3%)
Odeur (139) (61)	Aromatique, épicée, agréable, un peu acre
Aspect (139)	Liquide limpide
Couleur (139)	Jaune très pale à jaune
Densité (61)	0,915 à 0,930
Pouvoir rotatoire (61)	-19° à -10°
Indice de réfraction (141)	1.472
Composition (61) (106)	1.8- cinéol, linalol, géraniol, pinène, eugénol, phellandrène, sabinène, acétate d' α - terpényle, acide laurique, tanin, résine, mucilage
Propriétés (139) (66) (61)	Antiseptique, stomachique, carminative, antispasmodique, expectorante, diurétique, sudorifique, antirhumatismal, mucolytique, régulatrice du système nerveux, tonifiante, anti- inflammatoire, anticoagulante, antalgique puissante.
Indications (61)	Digestion lente et difficile, flatulences, inappétence, dyspepsie, asthme, bronchite, grippe, catarrhe pulmonaire, pédiculose, psoriasis, rhumatisme.
Usage (61)	interne et externe
Divers (75)	Domaine culinaire, en parfumerie
Effets secondaires (73) ; (139)	Sensibilisation de type allergique, due probablement aux lactones sesquiterpéniques.

Composition chimique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* :

La Composition chimique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* est résumée dans le tableau suivant :

Laurier d'Italie (139)	Laurier de la Sicile (20)	Laurier du Maroc	Laurier de l'Inde	Laurier (Composition en général) (5)		
		Rameaux feuillés (139)				
Feuilles		1.15		1-3 jusqu'à 19	Eugénol	Phénols
7.4	26.89			6-30	Linalol	Monoterpenol (Alcools)
	1.33	2.16	1.24	2-9	α-terpinéol	
	0.18				β-terpinéol	
	1.35	2.77	0.45	1-5	Terpinéol-4	
	0.25				Bornéol	
	0.07				Oct-1-en-3-ol	
	t				Hex-3-en-1-ol	
				t	En C15 (sesquiterpéniques)	Lactones
				t	Acide laurique	Acides
	0.18	2.68	1.03	+	p-cymène	Monoterpènes
	0.31				α-terpinène	
					β-terpinène	
	0.56	1.98	0.3		γ-terpinène	
	4.92	4.86	6.72	5-9	α-pinène	
	3.85	5.23	33.62	3-5	β-pinène	
	t			+	Limonène	
	0.65	0.69	0.88		Myrcène	
	0.81	0.4		+	Camphène	
10.6	7.11	8.89		6-10	Sabinène	
	0.15	0.34			α-phellandrene	
	0.41	0.25			α-thujène	
	0.21	0.22			Terpinolène	
	0.19	0.27			Δ ³ carène	
1.4	0.47		1.22	<1	β-caryophyllène	sesquiterpènes
	0.07				γ-cadinène	
			1.02		Δ-cadinène	
39.2	34.77	52.33	27.57	25-50	1-8 cinéol	Ethers
	2.02	3.82		2-5	Methyl-eugénol	
11.3	7.35	8.29	0.65	8-10	Acétate d'α-terpenyle	Esters terpéniques
	0.06				Acétate de neryl	
	0.57	0.13			Acétate de bornyle	
	0.06				Acétate de linalyle	

II. Le thym :

Les différentes espèces du Thym se trouvent dans toutes les zones tempérées d'hémisphère Nord (39). Ce sont des plantes sous- ligneuses érigées ou prostrées (131).

Plus de cent espèces sont connues, sur le pourtour du bassin méditerranéen, c'est certainement au Maroc que le genre *Thymus* présente la plus grande diversité (136).

Les espèces algériennes à feuilles linéaires constituent un complexe qu'il est souvent illusoire de chercher à déterminer d'une façon précise. Seule une révision générale des espèces nord-africaines permettra peut- être de résoudre ces questions (131).

Thymus fontanesii est parmi les 12 espèces existant en Algérie (131) :

Nom botanique : *Thymus fontanesii* (106)

All. : Thymian (106).

Angl. : Thyme (106).

Albanie : Timus (136).

Croatie : Timijan (136).

Italie : Timo (136).

Espagne : Tomillo (136).

Noms vernaculaires : Zaâteur (106).

Systematiques :

Selon **Quezel et Santa (1963)**, *Thymus fontanesii* est une espèce qui appartient à :

- | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| ❖ Règne : Plantae | ❖ Ordre : Tubiflorales |
| ❖ Embranchement : phanérogames | ❖ Sous / Ordre : Lamiales |
| ❖ S/Embranchement : Angiospermes | ❖ Famille : Labiées |
| ❖ Classe : Dicotylédones | ❖ Genre: <i>Thymus</i> |
| ❖ S/Classe : Gamopétales | ❖ Espèce : <i>Thymus fontanesii</i> |

Une deuxième classification donnée par **Heywood V.H. (1996)** :

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| ❖ Super- règne : Eucaryotes | ❖ Ordre : Lamiales |
| ❖ Règne : Plantae | ❖ Famille : Lamiaceae (labiatae) |
| ❖ Classe : Angiospermae | ❖ Genre : <i>Thymus</i> |
| ❖ S/classe : Dicotyledoneae | ❖ Espèce : <i>Thymus fontanesii</i> |
| ❖ Sur- ordre : Asteridae | |

Description :

Calice à 5 dents écartées plus ou moins étalées, ni comprimé ni rétréci, bien plus longues que le tube, à lèvre supérieure divisée dans son tiers supérieur.

Tiges dressées robustes. Feuilles oblongues- lancéolées entières et glabres, rarement hispides. Inflorescences plus ou moins interrompues vers le bas.

Fleurs blanches ou pales à peine plus longues que le calice (131).

Biotope : Algérie- Tunisie. Présente dans les pelouses et garrigue du Tell algérien (131).

Propriétés du thym : antiseptique, protecteur de l'intestin, diurétique, stomachique, stimulant de la leucocytose, antispasmodique, antitussif, expectorant (57) ; (61).

Selon Ghannadi A. et al. (2004), *Thymus fontanesii* est utilisé comme antispasmodique, carminatif, stomachique, expectorant, antitussif, antiseptique, anthelminthique.

Indications : grippe, rhume, maux de gorge, fatigue, toux spasmodique, asthme... (113) ; (62).

L'huile essentielle du genre *Thymus* :

	<i>Thymus vulgaris</i> (France) (61)	<i>Thymus zygis</i> (Espagne) (61)	<i>Thymus ciliatus</i> (Algérie) (9)	<i>Thymus algeriensis</i> (Algérie) (106)
Rendement	1,7 à 2,5%	0.4 à 0,7%	0.4% (Mai)	0.7 à 1.59% (14)
Densité	0,905 à 0,950	0,930 à 0,950	0,9484-0,9587	
Pouvoir rotatoire	-5° à 0°		-1°,2'	
Indice de réfraction	1,491 à 1,510		1,49	
Odeur	chaude	camphrée		thymolée
composition	Thymol, p- cymène, terpinène	Thymol, carvacrol	Thymol, carvacrol, bornéol (11)	Thymol, carvacrol, bornéol, cinéol, menthène, thymène.
Propriétés (61) ; (75) ; (92)	Antiseptique intestinal, pulmonaire et rénal, antibactérien, antifongique, insecticide, antioxydant.			
Indications (61) ; (75)	Maladies infectieuses, affections pulmonaires, digestives et intestinales, fatigue...			
Usage (61)	interne et externe			
Divers (61)	Domaine culinaire. La richesse de l'huile essentielle la rend plus agressive pour l'organisme.			

Composition chimique des huiles essentielles du genre *Thymus* :

La Composition chimique des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Thymus* est résumée dans le tableau suivant :

Deuxième partie :

Etude expérimentale

Etude Phytochimique**I. Provenance des plantes étudiées :**

	Le Laurier	Le Thym
Nom botanique	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Thymus fontanesii</i>
Origine	Tlemcen (Nedroma)	Mostaganem
Récolte	Décembre 2005/ Janvier 2006	Février / Mars 2006
Description	<p>Les feuilles du laurier, étudiées dans ce travail, sont des feuilles persistantes, lancéolées, alternes, luisantes et glabres, de 10 cm de long.</p> 	<p>Les feuilles du thym, étudiées dans ce travail, sont oblongues-lancéolées, entières et glabres, de 10 à 12 mm de long.</p> 
	<p>Les fruits sont des baies noirâtres.</p> 	<p>Feuilles sèches :</p> 



✦ : Localisation des stations

Figure 05 : Carte de localisation des stations d'étude (52).

Stations	Altitude	Latitude	Longitude	Etage climatique
Tlemcen (Nedroma)	450 m	35° 01' N	1° 44' O	Chaud et semi- aride
Mostaganem	Plus de 500 m	35° 56' N	0° 05' E	Chaud et semi- aride

Tab. 09 : Situation géographique et étage bioclimatique des stations d'étude (52).

II. Tests phytochimiques :

Les constituants de la plante issus du métabolisme secondaires, permettent une excellente identification de la drogue (163).

Pour les plantes dont la composition chimique n'est pas connue, et pour avoir une idée sur l'activité de la plante, nous devons chercher à identifier certains principes actifs (95).

Dans le présent travail, nous avons rechercher ces constituants dans deux plantes médicinales : le laurier et le thym. En se basant sur les données bibliographiques nous essayerons d'examiner la relation entre certaines propriétés médicinales et les constituants de ces plantes.

Les tests phytochimiques sont réalisés sur différents extraits préparés à partir des feuilles séchées et broyées, en utilisant cinq solvants de polarités différentes : Eau- Ethanol- Chloroforme- Ether diéthylique- Ether de pétrole. Ils sont généralement simples, rapides à mettre en œuvre, réalisés le plus souvent en tubes à essai. La méthode de détection des différentes familles de composés chimiques co- existantes, consiste en une réaction de précipitation ou une coloration par des réactifs spécifiques. Ces réactions se traduisent par l'apparition d'une turbidité, floculation ou un changement de couleur qui peuvent donner, suivant l'intensité du résultat obtenu, la concentration en certains constituants.

1. Résultats :

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux 10 et 11.

Les feuilles du laurier						
	Eau	Ethanol	Chloroforme	Ether diéthylique	Ether de pétrole	Résultats finals
Tanins	+++	-				Présence
Alcaloïdes	+	-		+		
Saponosides	++					
Anthracénosides		+				
Flavonoïdes		+++				
Stérols et stéroïdes		-			+	
Huile volatile				++		
Quinones libres					++	
Coumarines		-				Absence
Emodols				-		
Anthocyanosides		-				
Anthraquinones			-			

Tab.10 : Tests phytochimiques réalisés sur différents extraits préparés à partir des feuilles du Laurier.

Les feuilles du Thym						
	Eau	Ethanol	Chloroforme	Ether diéthylique	Ether de pétrole	Résultats finals
Tanins	++	++				Présence
Anthraquinones			+			
Saponosides	++					
Anthracénosides		++				
Flavonoïdes		+++				
Stérols et stéroïdes		-			++	
Huile volatile				+++		
Emodols				+		
Coumarines		-				Absence
Alcaloïdes	-	-		-		
Anthocyanosides		-				
Quinones libres					-	

Tab. 11 : Tests phytochimiques réalisés sur différents extraits préparés à partir des feuilles du Thym

La présence des saponosides est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées.

On prépare 10 tubes avec 1,2,.....,10 ml de l'extrait aqueux, le volume final est réajusté à 10ml avec de l'eau distillée. Après une agitation et un repos de 15mn, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm.

Si elle est proche de 1cm dans le x^e tube : $I = H^* 5/ 0.0x$ I : indice de mousse.

H : hauteur de mousse en cm dans le x^e tube.

La présence de saponosides dans la plante est confirmée par un indice supérieur à 100 (50).

1) Le laurier :

N° des tubes	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Hauteur de la mousse (cm)	0.5	0.9	1	1.1	1.3	1.4	1.4	1.5	1.6	1.6



$$I = 0.9 * 5 / 0.02 = 225$$

2) Le thym :

N° des tubes	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Hauteur de la mousse (cm)	0.4	1	1.5	1.9	1.9	2	2.6	2.6	2.6	3



$$I = 1 * 5 / 0.02 = 250$$

3) Résultat final :

Espèces	<i>Saponaria officinalis</i> (Témoin saponaire)	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Thymus fontanesii</i>
Indice de mousse	395	225	250

Tab.12 : Indices de mousse de *Laurus nobilis* et *Thymus fontanesii*.

Nous avons aussi procédé à un examen phytochimique sur quatre extraits préparés à partir des feuilles du laurier et du thym, séchées et broyées, en utilisant l'eau, l'éthanol, l'éther de pétrole et l'éther diéthylique et qui a pour but de mettre en évidence la présence ou l'absence des composés réducteurs, amidon, polyuronides et acides gras.

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux suivants :

Les feuilles du laurier					
	Eau	Ethanol	Ether diéthylique	Ether de pétrole	Résultats finals
Composés réducteurs	+++	+++			Présence
Polyuronides				+	
Acides gras			+		
Amidon	-				Absence

Tab. 13 : Recherche des composés réducteurs, polyuronides, amidon et acides gras dans les feuilles de *Laurus nobilis*.

Les feuilles du thym					
	Eau	Ethanol	Ether diéthylique	Ether de pétrole	Résultats finals
Composés réducteurs	+++	+++			Présence
Acides gras			+		
Polyuronides				-	Absence
Amidon	-				

Tab. 14 : Recherche des composés réducteurs, polyuronides, amidon et acides gras dans les feuilles de *Thymus fontanesii*.

2. Interprétation des résultats :

Les résultats expérimentaux mentionnés dans les tableaux 10 et 11, montrent que les **tanins**, les **flavonoïdes**, les **anthracénosides**, les **saponosides**, l'**huile volatile** et les **stérois et stéroïdes** sont présents dans les feuilles du laurier et du thym, en quantités variables.

L'intensité des résultats obtenus montre que les feuilles du laurier sont plus riches en tanins par rapport à celles du thym. Par contre l'huile volatile, stérois et stéroïdes et anthracénosides sont présents en quantités importantes dans les feuilles du thym par rapport à celles du laurier.

La présence des tanins dans les feuilles des deux plantes est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique donnant une coloration vert foncée, il s'agit donc des **tanins cathéchiques**.

Les indices de mousse présentés dans le tableau **12** confirment la présence des saponosides dans les feuilles des deux plantes. Cependant, le témoin saponaire a un indice presque une fois et demi plus important.

Il est prouvé que les huiles volatiles sont présentes en quantités importantes dans les deux plantes **(49) ; (139)**.

La présence des flavonoïdes dans le laurier est confirmée par les données de **Roulier G. (2005)**, tandis que les données de **Valnet J. (2001)** et de **Fintelmann V. et Weiss R.F. (2004)** confirment la présence des tanins et des saponines dans le thym (*Thymus vulgaris*)

Thymus atlanticus et *Thymus satureioides* sont deux espèces du thym, originaires de Haut Atlas et qui ont fait l'objet, avec d'autres plantes médicinales, d'une étude phytochimique réalisée par **Lamnaouer D.(2002)**. Cette étude a montré que les tiges feuillées des deux espèces contiennent des flavonoïdes et que *Thymus atlanticus* contient des tanins galliques.

Enfin, nous avons pu remarquer la présence des **quinones libres** et des **alcaloïdes** dans les feuilles du laurier, des **emodols** et des **anthraquinones** dans les feuilles du thym, et l'absence totale des **coumarines** et des **anthocyanosides** dans les feuilles des deux plantes étudiées.

Les résultats des réactions aux réactifs de Dragendorff et de Mayer, ont montré l'absence des alcaloïdes dans les tiges feuillées de *Thymus atlanticus* et *Thymus satureioides* **(95)**.

Les résultats mentionnés dans les tableaux **13** et **14** nous a permis de révéler la présence des **sucres réducteurs** et des **acides gras** dans les feuilles des deux plantes étudiées, la présence des **polyuronides** dans les feuilles du laurier et leur absence dans les feuilles du thym et l'absence totale de l'**amidon** dans les feuilles des deux plantes.

3. Conclusion :

Laurus nobilis et *Thymus fontanesii* apparaissent donc être des plantes riches en métabolites secondaires, largement utilisée en médecine traditionnelle pour combattre et guérir différents maux.

Le pouvoir antimicrobien du thym et du laurier peut être expliqué par la présence des huiles essentielles, des tanins et des flavonoïdes.

Les effets anti- inflammatoire, antispasmodique, antitussif et diurétiques de ces deux plantes peuvent être attribués à leur richesse en flavonoïdes et en saponosides. Tandis que la présence des alcaloïdes dans les feuilles du laurier peut expliquer leurs effets stimulants.

Une exploitation de ces propriétés pharmacologiques implique une recherche plus poussée de ces principes actifs, par la mise en œuvre des techniques d'extraction, de purification, de séparation, de recristallisation et d'identification.

III. Extraction des huiles essentielles :

Parmi les grandes familles de métabolites secondaires qui sont douées d'activités pharmacologiques on trouve les huiles essentielles.

Echantillonnage : une fois la plante cueillie, les feuilles ont été séchées pendant 10 à 15 jours à l'ombre et à la température ambiante.

Procédé d'obtention : distillation par entraînement à la vapeur d'eau.

Durée d'extraction : 2h 30mn.

Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites :

	Couleur	Odeur	Saveur
Huile essentielle du laurier	Jaune	Aromatique, agréable	Un peu piquante
Huile essentielle du thym	Jaune rougeâtre	Aromatique, âcre	Fortement piquante

Tab. 15 : Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites.

Calcul du rendement :

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue à la masse du végétal sec.

Rdt : Le rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage.

M₀ : La masse en gramme de la masse végétal à traiter sèche.

M : La masse en gramme de l'huile essentielle.

Pour la même plante, nous avons pratiqué plusieurs extractions. Le rendement moyen d'huile essentielle est obtenu par la moyenne arithmétique :

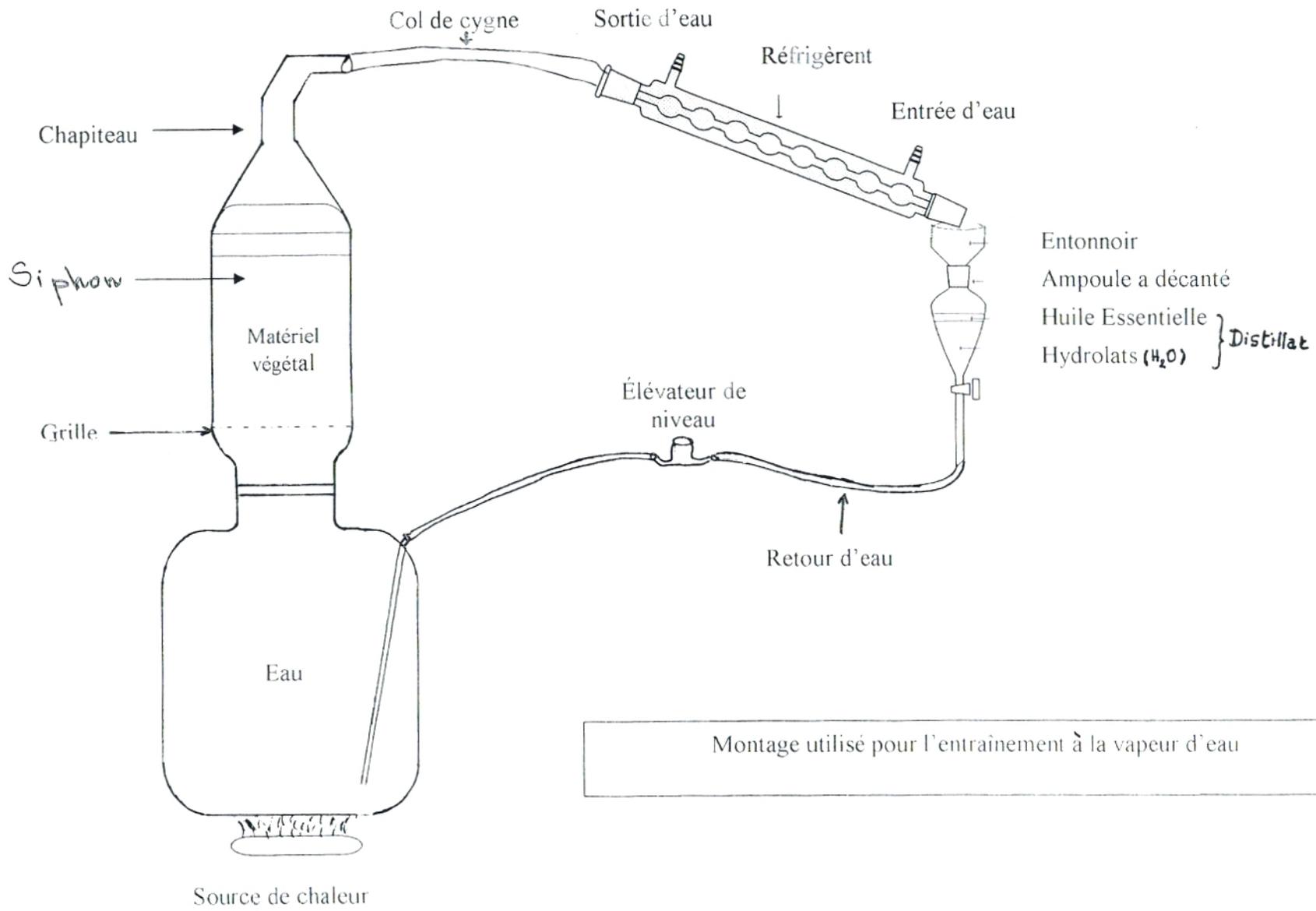
$$\text{Rdt}' = \left(\frac{\sum M}{\sum M_0} \right) \times 100 \quad \text{Rdt}' : \text{Le rendement moyen.}$$

Teneurs en huiles essentielles :

Les rendements calculés sont représentés dans le tableau suivant :

	Rendements moyens (%)
Huile essentielle du laurier	1.2 (valeur min : 0.8, valeur max : 1.57)
Huile essentielle du thym	2 (valeur min : 1.75, valeur max : 2.23)

Tab. 16 : Les rendements en huiles essentielles du laurier et du thym.



Montage utilisé pour l'entraînement à la vapeur d'eau

Nous constatons que les rendements en huile essentielle du laurier et du thym sont importants. Le rendement en huile essentielle du laurier est de 1.2%. Cette valeur est comprise dans l'intervalle donné par Roulier G. (2005) pour la même espèce. En comparant ce rendement avec ceux donnés par la littérature, nous avons pu remarquer qu'il est inférieur à celui donné par Steinman H (2005) et est supérieur à ceux donnés par Richard H (1992), Plate P (1997) pour les feuilles de la même espèce et Macchioni et al (2006).

Le rendement en huile essentielle de *Thymus fontanesii* obtenu par Dob T. et al (2006) est de 0.9%. Ce résultat est largement inférieur au nôtre, soit 2%. Cette valeur est aussi supérieure à celle donnée par Fesneau M. (2005) pour *Thymus zygis* et par Benabdellah S.A., Hassaine A. (2002) pour *Thymus ciliatus* Ssp coloratus.

D'autre part, elle est légèrement supérieure à celle obtenue par Bensaha D. Mekkaoui T. (2001) pour *Thymus algeriensis* et est comprise dans les intervalles donnés par Fesneau M. (2005) pour *Thymus vulgaris* et Benabdellah S.A., Hassaine A. (2002) pour *Thymus ciliatus* Ssp Eu-ciliatus.

Les espèces		Teneurs en HE (%)		Les références
<i>Laurus nobilis</i>		2		Steinman H., 2005
		0.8 à 4		Roulier G., 2005
		0.5 à 1		Richard H., 1992
	Fruits	2 à 3		Plate P., 1997
	Feuilles	1		
		0.6		Macchioni et al, 2006
<i>Laurus novocanariensis</i>	Feuilles	0.8		
<i>Thymus fontanesii</i>	Tiges feuillées	0.9		Dob T. et al, 2006
<i>Thymus vulgaris</i>		1,7 à 2,5		Fesneau M., 2005
<i>Thymus zygis</i>		0.4 à 0,7		
<i>Thymus ciliatus</i>	Ssp coloratus	0.1- 0.4		Benabdellah S.A., Hassaine A., 2002
	Ssp Eu-ciliatus	1.55- 4.26		
<i>Thymus algeriensis</i>		0.7 à 1.59		Bensaha D. Mekkaoui T., 2001

Tab. 17 : Comparaison des rendements en huiles essentielles du laurier et du thym avec ceux de la littérature.

Extraction des extraits hydrosolubles à partir des Hydrolats (eaux aromatiques) :

Les hydrolats ou hydrosols sont les eaux récoltées lors de la distillation des plantes pour en faire de l'huile essentielle. Ils contiennent des infimes proportions d'huile essentielle en plus de nombreux extraits hydrosolubles de la plante, qu'on ne retrouve pas dans l'huile. Les propriétés de ces éléments hydrosolubles ne sont pas tout à fait identiques à celles de l'huile essentielle correspondante, mais elle leur ressemble beaucoup.

Calcul du rendement par rapport à la masse du matériel végétal : il est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle et des extraits obtenues à partir des hydrolats à la masse du végétal sec.

Rdt : Le rendement en extraits hydrosolubles exprimé en pourcentage.

M₀ : La masse en gramme de la masse végétal à traiter sèche.

M : La masse en gramme des extraits hydrosolubles extraits à partir des hydrolats.

Les rendements sont résumés dans le tableau suivant :

	Rendements (%)
Laurier	0.3
Thym	0.4

Tab. 18 : Les rendements en extraits hydrosolubles extraits à partir des Hydrolats.

Les rendements calculés par rapport à la masse du matériel végétal sont **0.3%** pour le laurier et **0.4%** pour le thym. Ils représentent **20 à 25%** des rendements en huiles essentielles obtenus.

Propriétés organoleptiques des extraits hydrosolubles des eaux aromatiques :

Extraits hydrosolubles	Couleur	Odeur	Saveur
Laurier	Jaune foncé	Aromatique, agréable, un peu âcre	Piquante
Thym	Rouge noirâtre	Acre	Fortement piquante

Tab. 19 : Propriétés organoleptiques des extraits hydrosolubles.

Etude Physicochimique Des Huiles Essentielles

La qualité des huiles essentielles dépend de nombreux facteurs, parmi lesquelles le procédé d'obtention, l'état de maturation et de conservation de la substance, sa provenance.

La conservation des huiles essentielles exige des flacons bien bouchés, leur maintien à l'abri de l'air et de la lumière. Il importe en effet, d'éviter leur oxydation, leur polymérisation et leur résinification que chacun a été à même d'observer lorsque ces précautions n'étaient pas respectées (155).

Les mesures physicochimiques sont parmi les facteurs utilisés dans la définition de la qualité des huiles essentielles.

I. Contrôle de qualité des huiles essentielles du *Laurus nobilis* et du *Thymus fontanesii* :

Dans notre travail, les huiles essentielles étaient entreposées dans un endroit frais à l'abri de la lumière où elles ont reposé pour être ensuite filtrées et conditionnées.

Afin de déterminer la qualité de nos huiles essentielles, nous avons déterminé un certain nombre de caractères :

- ❖ **Les caractères physiques** : densité, indice de réfraction, variation polarimétrique, solubilité dans l'alcool, point de congélation ;
- ❖ **Certaines caractéristiques chimiques** : indice d'acide, indice d'ester, indice d'iode, indice de peroxyde.

1. Résultats :

Les résultats de l'analyse physico-chimique obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Les propriétés	Les valeurs	
	Huile essentielle du Laurier	Huile essentielle du Thym
Densité spécifique	0.9159	0.9219
Indice de réfraction à 20°	1.4744	1.4999
Pouvoir rotatoire	-26.4705 (Lévogyre)	+3.4313 (Dextrogyre)
Miscibilité à l'éthanol à	1ml/0.5ml jusqu'à 20ml d'éthanol	1ml/0.6ml jusqu'à 20ml d'éthanol
Point de congélation	< -20°	
Indice d'acide	2.244	1.458
Indice d'ester	22.44	16.83
Indice d'iode	418.77	502.524
Indice de peroxyde	9600	8000

Tab. 20 : Les indices physico-chimiques des huiles essentielles fraîchement extraites du thym et du laurier.

2. Discussion :

En comparant nos résultats avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs (**tableaux 21,22, 23**), nous constatons que :

Du point de vue physique :

La densité est un caractère physique constituant un point de repère important. Les valeurs de la densité de nos huiles essentielles sont de **0.9219** pour l'huile du thym et **0.9159** pour celle du laurier. En se referant au tableau suivant (**32**), on remarque que nos huiles essentielles sont de composition complexe.

	D < 0.9	0.9 < D < 1	D > 1
Huiles essentielles	Riches en terpènes	Ont une composition complexe	Contiennent toujours des produits de la série aromatique, des sulfures, des nitrites.

► Huile essentielle du Thym :

- * La valeur de la densité de cette huile est comprise dans l'intervalle donné par **Garnero (1991)** et **Fesneau M. (2005)** pour l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* et dans celui donné par **Bensaha (2001)** pour celle du *Thymus algeriensis*. Elle est supérieure aux valeurs obtenues pour l'huile du *Thymus ciliatus ssp Coloratus* et est légèrement supérieure à celles des huiles essentielles du *Thymus serpylloides*, *Thymus longiflorus* et *Thymus fontanesii*. Par contre, elle est inférieure aux valeurs données pour les huiles essentielles du *Thymus ciliatus ssp Eu-ciliatus* et du *Thymus zygis (0.930-0.950)*.
- * L'indice de réfraction est de **1.4999**, cette valeur est comprise dans l'intervalle donné par **Fesneau M. (2005)** pour l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* et est proche des valeurs données pour les huiles essentielles du *Thymus ciliatus ssp Eu-ciliatus*, *Thymus serpylloides* et du *Thymus fontanesii*. Cet indice est supérieur à ceux obtenus par **Benabdellah S.A., Hassaine A. (2002)** et **Daoudi A., Djebbari F. (2003)** pour l'huile essentielle du *Thymus ciliatus ssp Coloratus* et par **Cruz Garcia et coll. (1988)** pour l'huile essentielle du *Thymus longiflorus*.
- * La déviation polarimétrique de notre huile essentielle est de **+3°, 4313'**. Elle nous a permis de déduire que notre huile essentielle est **dextrogyre**, alors que les huiles essentielles des 5 espèces du thym représentées dans le tableau sont lévogyres sauf l'huile du *Thymus longiflorus* qui est aussi dextrogyre avec une valeur inférieure à la nôtre.
- * Le point de congélation est en déca de **- 20°C**.
- * Notre huile essentielle est miscible à **0.6 volumes d'éthanol à 95°**, ce résultat est largement inférieur à ceux obtenus aux travaux antérieurs.

► Huile essentielle du Laurier :

- * La valeur de la densité de notre huile essentielle est comprise dans les intervalles donnés par **Fesneau M. (2005)** et **Gildemeister et Hoffmann (1959)** et est légèrement supérieure à celle obtenue par **Sari H. (2003)**. Ce résultat est inférieur à ceux donnés par **Benmoussat M., Chikh I. (1996)** et par **Housni F. (1983-1984)** pour l'huile essentielle du Maroc.
- * L'indice de réfraction est de **1.4744**, ce résultat est très proche de ceux donnés par **Sari H. (2003)** et **Fesneau M. (2005)**. Il est supérieur à ceux obtenus par **Benmoussat M., Chikh I. (1996)** et **Housni F. (1983-1984)** et est compris dans l'intervalle donné par la littérature (**Gildemeister et Hoffmann, 1959**).
- * La déviation polarimétrique de notre huile essentielle est de **-26°, 4705'**. Elle nous a permis de déduire que notre huile essentielle est **lévogyre**. Cette valeur est inférieure à celles données par **Fesneau M. (2005)**, **Benmoussat M., Chikh I. (1996)** et **Housni F. (1983-1984)**
- * Le point de congélation est en déca de **- 20°C**.
- * Notre huile essentielle est miscible à **la moitié de son volume d'éthanol à 95°**. Ce résultat est largement inférieur à ceux obtenus par **Sari H. (2003)** et **Benmoussat M., Chikh I. (1996)**.

Du point de vue chimique :

► Huile essentielle du Thym :

- * La valeur de l'indice d'acide de l'huile essentielle du Thym est de **1.458**. Cette valeur est proche de celle de *Thymus ciliatus* de Sidi djillali. Elle est inférieure à celles obtenues par **Benabdellah S.A. et Hessaine A. (2002)** pour l'huile de *Thymus ciliatus ssp Coloratus*, et est largement inférieure à celles données par **Naves (1974)** pour *Thymus vulgaris* et *Thymus hymalis*. Par contre cet indice est légèrement supérieur à celui de *Thymus ciliatus* de Terny et est largement supérieur à toutes les valeurs données pour l'huile de *Thymus fontanesii* de différentes stations.
- * L'indice d'ester de notre huile essentielle est de **16.83**. Cette valeur est proche de celle de *Thymus vulgaris*, mais elle est largement inférieure à celles de *Thymus ciliatus ssp Coloratus* et de *Thymus hymalis*. Elle est supérieure à celles obtenues **Salhi M. (1998)** pour l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*, et est largement supérieure à celles obtenues pour l'huile de *Thymus fontanesii* de différentes stations.
- * Les valeurs de l'indice de peroxyde de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* des deux stations de Remchi et Sabâa chioukh, obtenues par **Benladghem R. et Otmani Z. (2006)**, sont proches de la valeur de notre huile essentielle qui est de **8000**. cette valeur est inférieure à celle obtenue pour *Thymus ciliatus ssp Coloratus*, et est largement inférieure à celle de *Thymus fontanesii* de la station de Sebdou. Alors que l'huile de *Thymus fontanesii* de la station de Remchi a un indice de peroxyde largement plus supérieur que le nôtre.
- * L'indice d'iode de notre huile essentielle est de **502.524**.

■ Huile essentielle du Laurier :

- * La valeur de l'indice d'acide montre que notre huile essentielle est plus acide que celles étudiées par **Sari H. (2003)** et **Benmoussat M., Chikh I. (1996)**, qui ont trouvé la même valeur de cet indice. Ce résultat est proche de ceux donnés par **Housni F. (1983-1984)** et **Gildemeisrter et Hoffmann (1959)**.
- * La valeur de l'indice d'ester est de **22.44**, elle est inférieure à celle donnée par **Sari H. (2003)**, **Benmoussat M., Chikh I. (1996)** et **Housni F. (1983-1984)**. Mais les 4 valeurs sont comprises dans l'intervalle donné par la littérature (**Gildemeisrter et Hoffmann, 1959**).
- * L'indice de peroxyde est de **9600**. il est supérieur à celui obtenu par **Sari H. (2003)**.
- * La valeur de l'indice d'iode est égale à **418.77**. Cette valeur est très proche de celles obtenues par **Benmoussat M.** et **Chikh I. (1996)**.

	<i>Thymus serpylloides</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus algeriensis</i>	<i>Thymus ciliatus</i>		<i>Thymus longiflorus</i>	<i>Thymus fontanesii</i>	
				<i>Ssp coloratus</i>	<i>Ssp Eu-ciliatus</i>			
Densité relative	0,9	0,9-0,955	0.8846-0.9326	0.8330-0.8720	0,9484-0,9587	0.917	0.815-0.916	0.9219
Indice de réfraction	1,496	1.491 à 1.510	-	1,4614-1.4650	1,49	1.470	1.5060-1.5071	1.4999
Pouvoir rotatoire	-9°,16'	-5 °à 0°	-3°, 15'	-	-1°,2'	+1°, 8'	-2°,487' à -2°, 076'	+3°,4313'
Point de congélation	-	-	<-20°	<-18°	<-18°	-	<-30°	< -20°
Miscibilité à l'éthanol	1g/9ml	2V/1V-3V/1V	5V/1V	2V/1V	3V/1V	2g/7ml	2.5V à 3V/ 1V	0.6V/1V
Auteurs	Crespo et Coll, 1987	Garnero, 1991 Fesneau M., 2005	Bensaha, Mekkaoui, 2001	Benabdellah, Hassaine, 2002/ Daoudi A., Djebbari F., 2003	Benabdellah, Hessain, 2002	Cruz Garcia et coll, 1988	Benladghem R., Otmani Z., 2006	Nous même

Tab. 21 : Comparaison des caractères physiques d'HE de *Thymus fontanesii* avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs pour les différentes espèces du genre *Thymus*.

	<i>T ciliatus ssp coloratus</i>	<i>T ciliatus</i>		<i>T vulgaris</i>	<i>T hymalis</i>	<i>T fontanesii</i>				
		<i>Sidi djillali</i>	<i>Terny</i>			<i>Sidi abdelli</i>	<i>Remchi</i>	<i>Sebdou</i>	<i>Sebâa chioukh</i>	<i>Mostaganem</i>
Indice d'acide	2.805-3.366	1.03	0.82	8.4	32	0.25	0.655	0.49	0.42	1.458
Indice d'ester	97.40-98.18	6.21	7.99	18.2	59.2	2.99	3.2	2.01	4.08	16.83
Indice de peroxyde	16000*	-	-	-	-	9400	21520	6600	9600	8000
Auteurs	Benabdellah, Hassaine, 2002/ *Daoudi A., Djebbari F., 2003	Salhi M., 1998		Naves, 1974		Benladghem R., Otmani Z., 2006				Nous même

Tab.22 : Comparaison des caractères chimiques d'HE de *Thymus fontanesii* avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs pour les différentes espèces du genre *Thymus*.

	Laurus nobilis					
Densité relative	0,915 à 0,930	0.903	0.9295	0.9275	0.910-0.944	0.9159
Indice de réfraction	1.472	1.472	1.465	1.467	1.460- 1.477	1.4744
Pouvoir rotatoire	-19° à -10°	-	-0°, 4'	-14°, 47'	-	-26, 4705'
Point de congélation	-	<-18°	1°C	-	-	<-20°
Miscibilité à l'éthanol	-	2.5V/V	2.5V d'éthanol à 90°/1V	-	-	1V d'éthanol 95°/2V
Indice d'acide	-	1.683	1.683	2.8	<3	2.244
Indice d'ester	-	43.197	38.98	36.95	21 à 55	22.44
Indice de peroxyde	-	6400	-	-	-	9600
Indice d'iode	-	-	487.29	-	-	418.77
Auteurs	Fesneau M., 2005	Sari H., 2003	Benmoussat M., Chikh I., 1996	Housni F., 1983- 1984	Gildemeisrter et Hoffmann, 1959	Nous même

Indices physiques des extraits hydrosolubles des eaux aromatiques :

	Laurier	Thym
Densité relative	0.8586	0.8398
Indice de réfraction	1.4760	-
Pouvoir rotatoire	-13°,65'	-
Miscibilité à l'éthanol	1.5V/V	3V/V

Tab. 24 : Indices physiques des extraits hydrosolubles des eaux aromatiques

Pour les deux plantes, les densités des extraits hydrosolubles sont inférieures à celles des huiles essentielles.

L'indice de réfraction des extraits hydrosolubles du laurier est légèrement supérieur à celui de l'huile essentielle du laurier. La déviation polarimétrique est de **-13°,65'**. Elle nous a permis de déduire que notre échantillon est **lévogyre**. Cette valeur est supérieure à celles de l'huile essentielle du laurier.

Pour le thym et le laurier, ces extraits nécessitent des volumes d'éthanol supérieurs à ceux obtenus pour les huiles essentielles pour être miscibles.

Pour les extraits obtenus à partir des eaux aromatiques du thym, nous n'avons pas pu obtenir les valeurs de l'indice de réfraction et de la déviation polarimétrique car l'échantillon contient des granules.

II. Evolution des caractères chimiques au cours du temps :

Dans cette partie, nous avons suivi l'évolution de 4 indices chimiques à savoir l'indice d'acide, l'indice d'ester, l'indice d'iode et l'indice de peroxyde.

A cet effet, nous avons conservé 2 échantillons de nos huiles essentielles (huile essentielle du laurier et huile essentielle du thym) dans des tubes en verre hermétiquement fermés, enveloppés pendant 150 jours à deux températures différentes : 4°C et la température ambiante, et 1 échantillon de nos huiles essentielles dans des tubes en verre hermétiquement fermés, non enveloppés pendant 150 jours à la température ambiante.

Les indices ont été effectués chaque 15 jours pour les 3 échantillons.

1. Résultats :

Les résultats obtenus sont regroupés dans les **tableaux 25 et 26**, illustrés par les **figures 06, 07, 08, 09, 10, 11,12 et 13**.

Indice de	conservation		J ₀	J ₁₅	J ₃₀	J ₄₅	J ₆₀	J ₇₅	J ₉₀	J ₁₀₅	J ₁₂₀	J ₁₃₅	J ₁₅₀
Acide	4°C		2.244	2,244	2,693	3,141	3,927	4,151	4,6002	5,273	5,61	6,619	6,581
	T° ambiante	A l'abri de la lumière		3,08	3,478	4,375	5,05	6,732	6,171	7,068	7,983	8,07	8,976
		Exposée à la lumière		3,927	3,814	4,824	5,722	7,068	7,859	7,757	8,751	9,42	10,09
Ester	4°C		22.44	28,05	36,57	50,49	67,32	67,32	84,15	140,25	84,15	100,98	112,2
	T° ambiante	A l'abri de la lumière		44,88	56,1	84,15	106,59	100,98	140,25	163,71	188,798	196,35	224,4
		Exposée à la lumière		56,1	67,32	95,37	112,2	117,81	112,2	213,18	207,57	230,01	252,45
Iode	4°C		418.77	444,15	507,6	583,74	609,12	611,65	614,19	619,96	621,81	634,5	641,87
	T° ambiante	A l'abri de la lumière		532,98	596,43	604,044	614,19	629,42	634,5	641,87	629,42	647,19	664,83
		Exposée à la lumière		586,278	598,968	609,12	619,27	634,5	647,19	648,71	634,5	659,88	667,5
Peroxyde	4°C		9600	11520	14400	14720	16000	18800	19200	20480	17600	11200	15680
	T° ambiante	A l'abri de la lumière		12000	15000	16960	17600	19200	12800	16000	22400	20800	25600
		Exposée à la lumière		14000	17600	19200	20800	17600	20800	19200	24000	25600	27200

Tab. 25 : Variation des indices chimiques de l'huile essentielle du Laurier au cours du temps et en fonction de sa conservation.

Indice de	conservation		J ₀	J ₁₅	J ₃₀	J ₄₅	J ₆₀	J ₇₅	J ₉₀	J ₁₀₅	J ₁₂₀	J ₁₃₅	J ₁₅₀
Acide	4°C		1.458	1,683	2,356	2,468	2,692	3,253	3,59	4,201	4,375	4,488	5,161
	T° ambiante	A l'abri de la lumière		2,244	2,524	3,478	3,478	4,488	4,619	5,049	5,049	5,61	6,62
		Exposée à la lumière		2,356	2,692	3,254	4,488	5,497	4,712	5,385	6,17	6,507	6,95
Ester	4°C		16.83	22,4	28,05	56,1	61,71	67,32	84,15	95,37	106,59	100,98	123,42
	T° ambiante	A l'abri de la lumière		44,88	56,1	39,27	112,2	151,47	164,99	196,35	224,4	230,01	280,5
		Exposée à la lumière		61,71	78,54	112,2	56,1	39,27	188,79	218,79	168,3	252,45	308,95
Iode	4°C		502.524	507,6	520,29	522,82	571,05	553,28	596,43	601,5	601,5	604,044	609,12
	T° ambiante	A l'abri de la lumière		525,366	532,98	571,05	576,126	596,43	609,12	609,12	604,044	616,74	621,81
		Exposée à la lumière		527,904	545,67	571,05	601,5	604,044	616,73	601,5	609,12	621,81	634,5
Peroxyde	4°C		8000	11200	12800	15600	16000	19200	11200	11528	7120	6720	8800
	T° ambiante	A l'abri de la lumière		12800	19200	22500	27200	12800	14400	7200	12800	4320	9600
		Exposée à la lumière		14400	19200	27200	22500	17600	12800	6400	12800	4480	12000

Tab. 26 : Variation des indices chimiques de l'huile essentielle du Thym au cours du temps et en fonction de sa conservation.

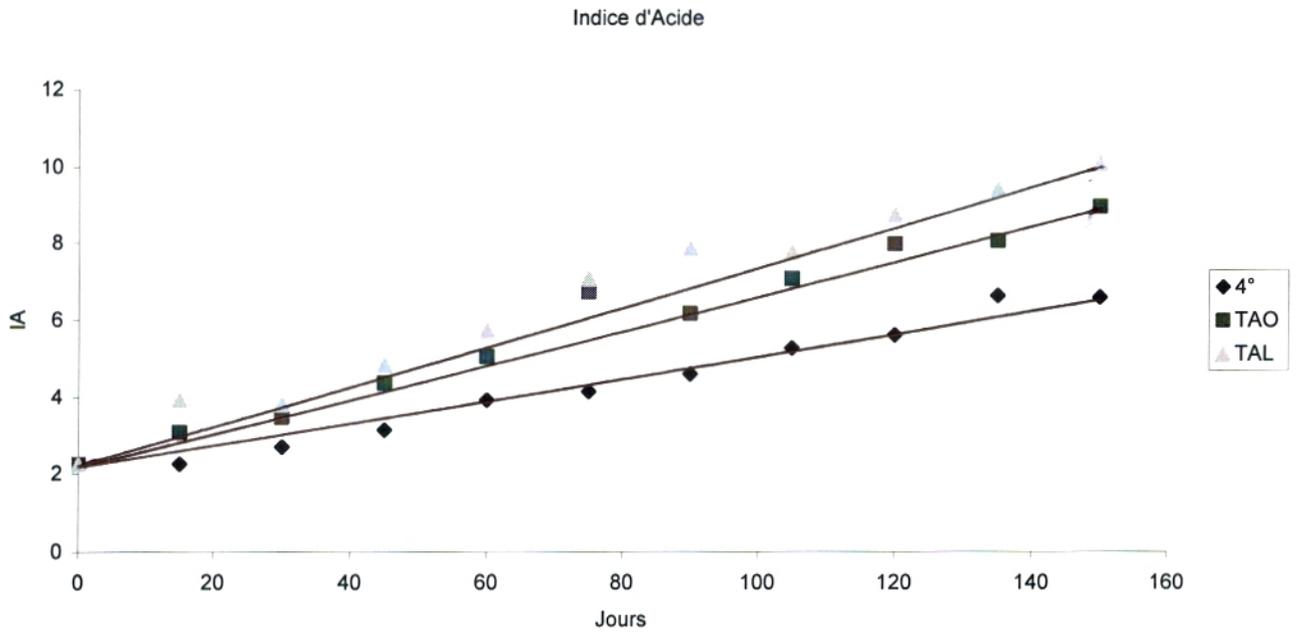


Figure 06 : Courbe de variation de l'IA de l'HE du *Laurus nobilis*

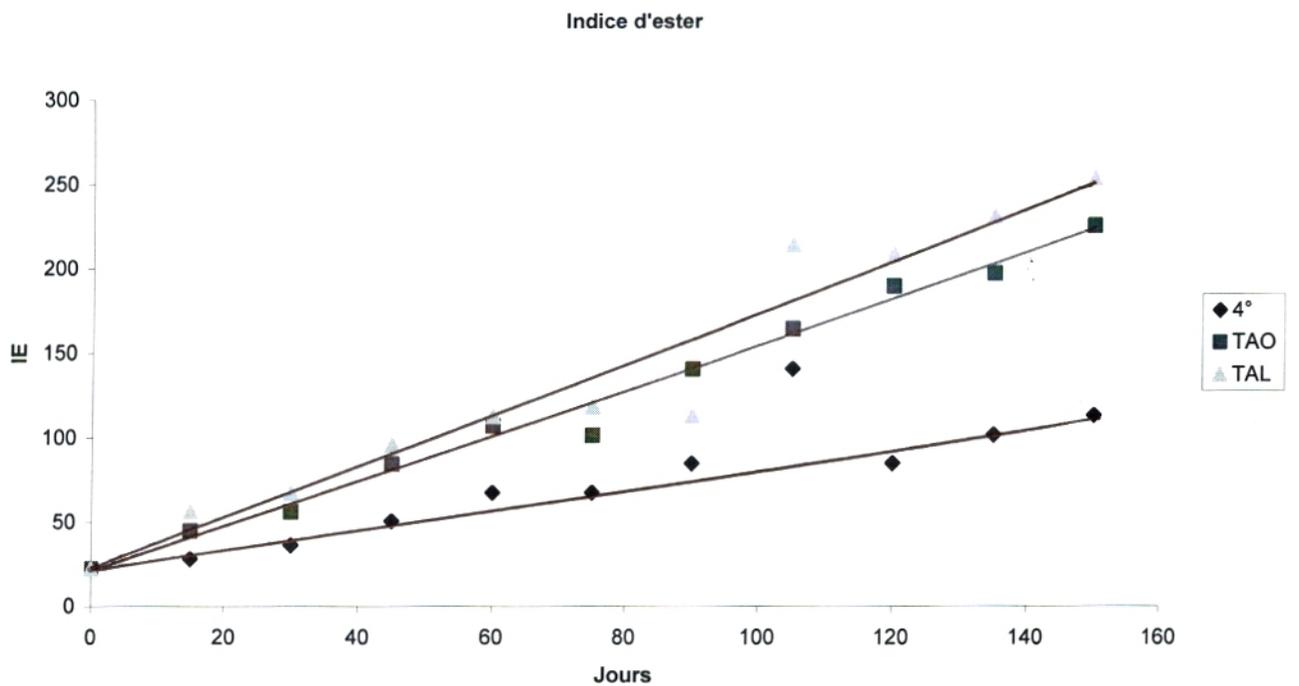


Figure 07 : Courbe de variation de l'IE de l'HE du *Laurus nobilis*

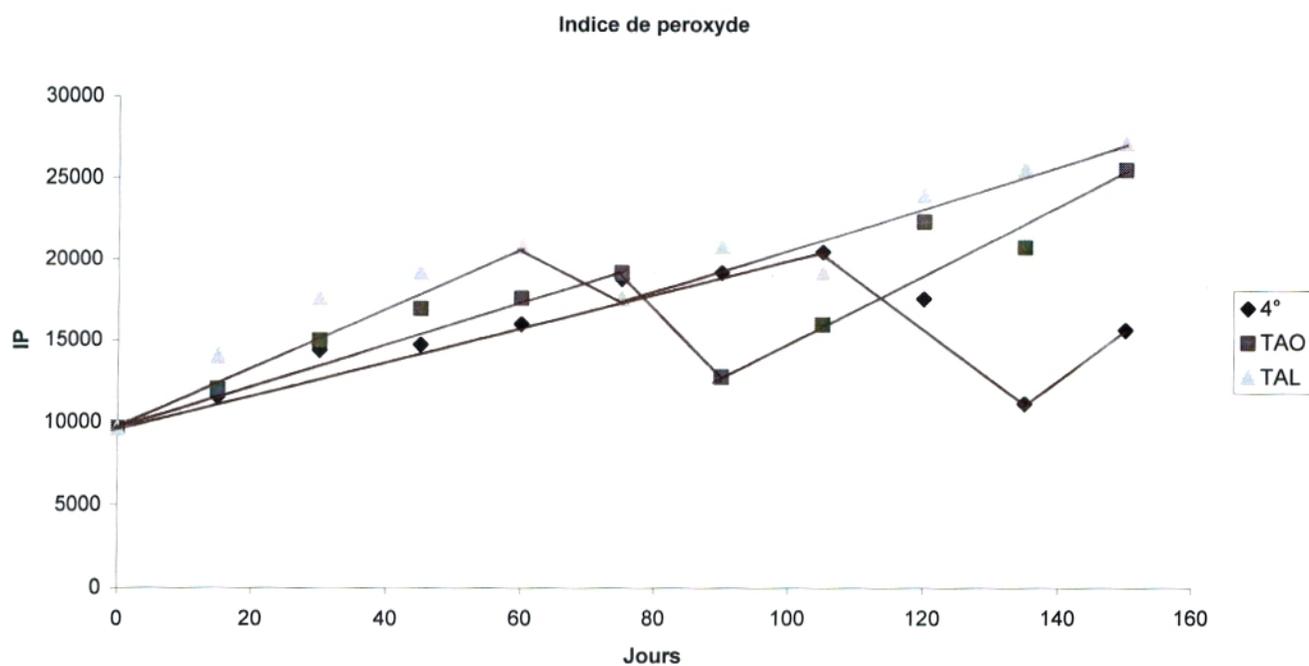


Figure 08 : Courbe de variation de l'IP de l'HE du *Laurus nobilis*

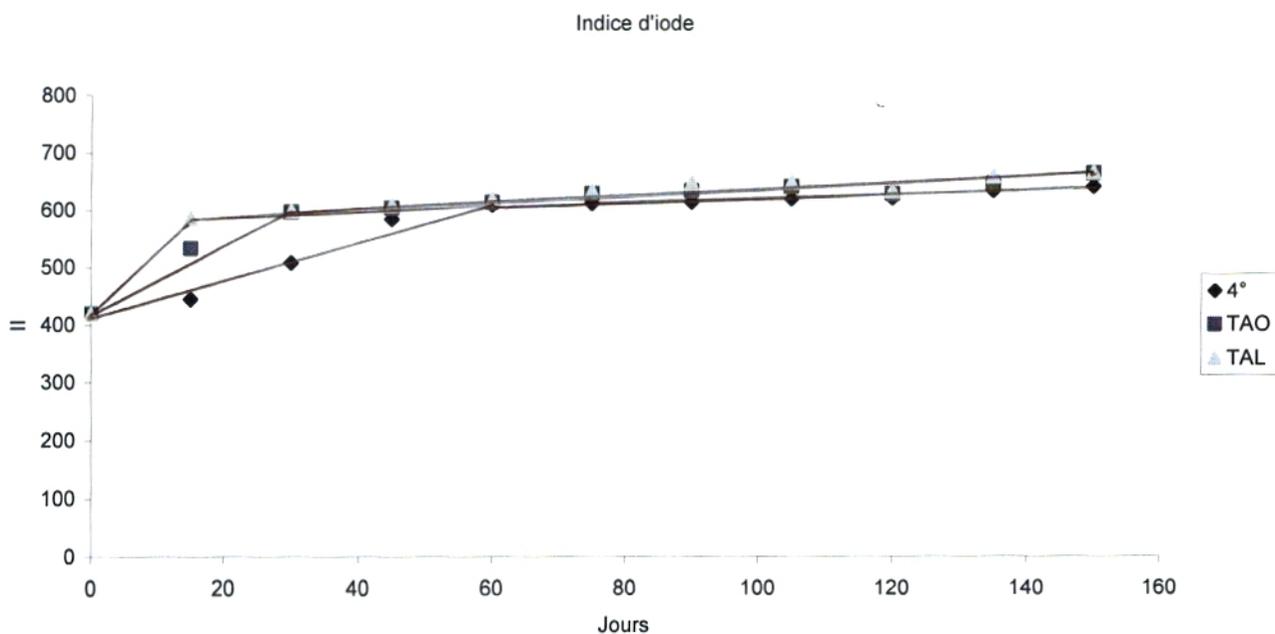


Figure 09 : Courbe de variation de l'II de l'HE du *Laurus nobilis*

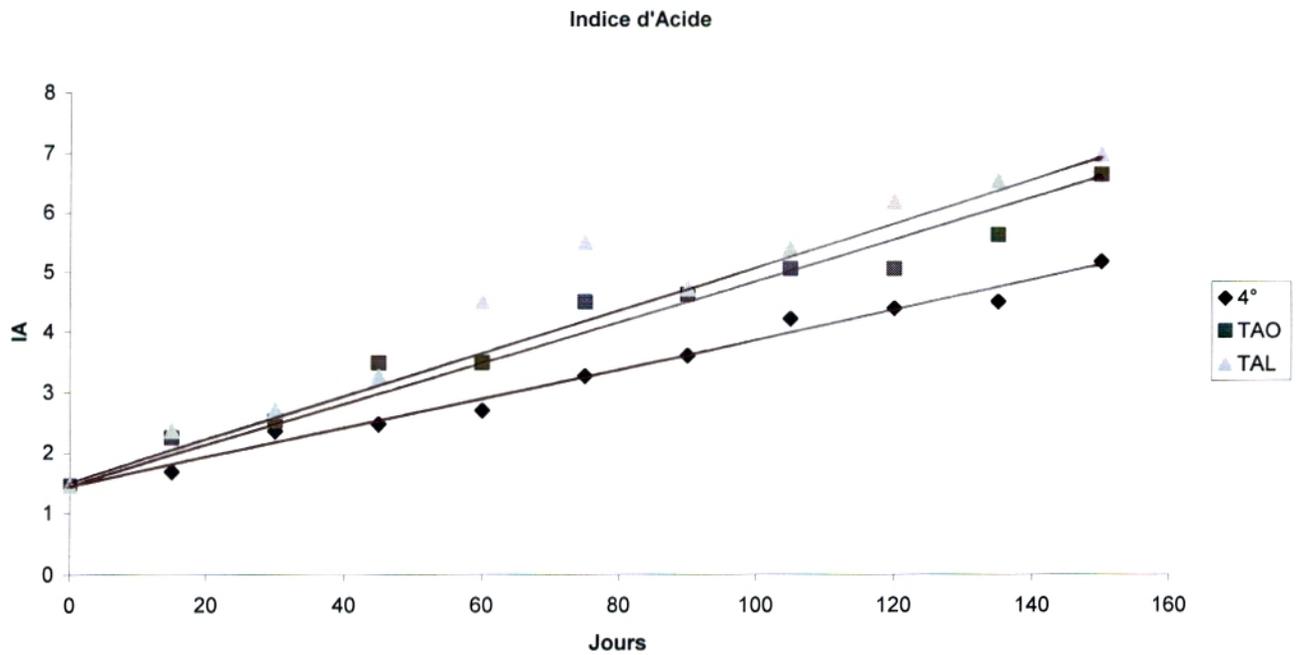


Figure 10 : Courbe de variation de l'IA de l'HE du *Thymus fontanesii*

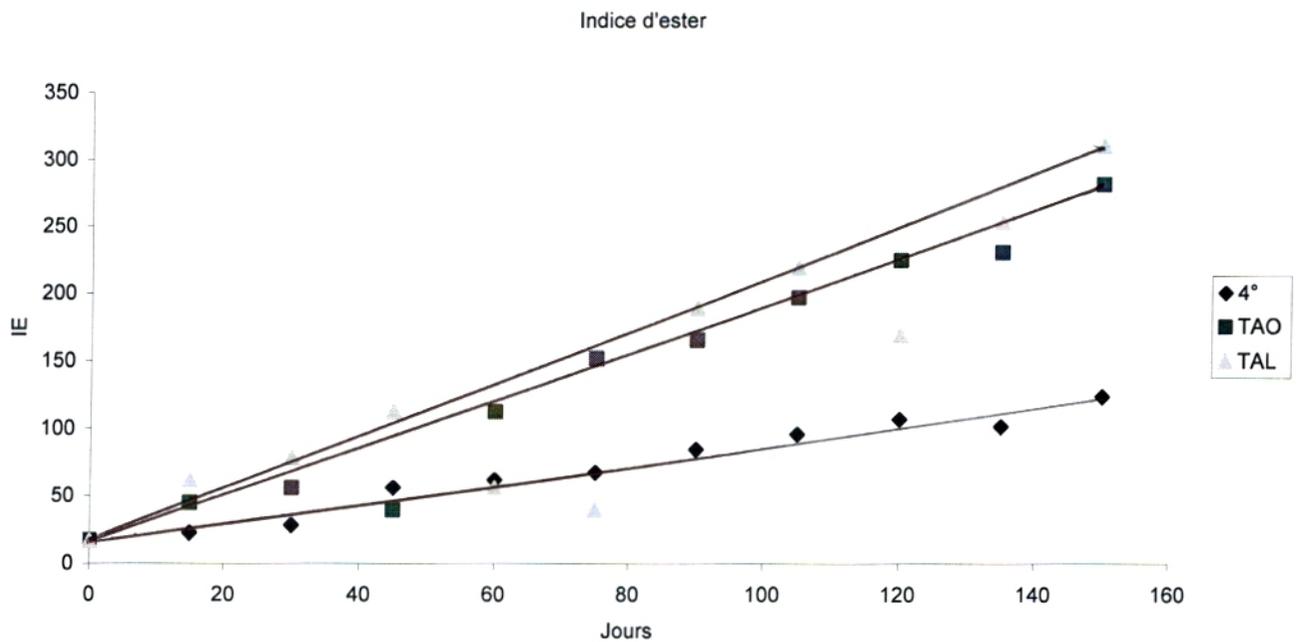


Figure 11 : Courbe de variation de l'IE de l'HE du *Thymus fontanesii*

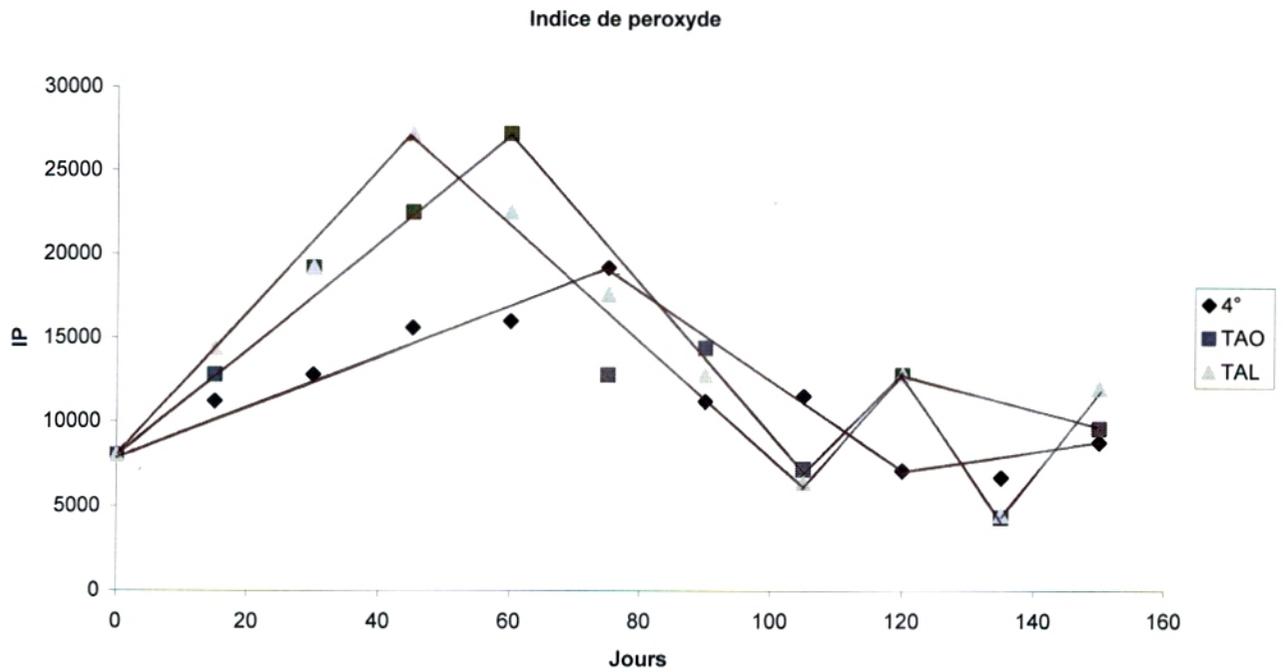


Figure 12 : Courbe de variation de l'IP de l'HE du *Thymus fontanesii*

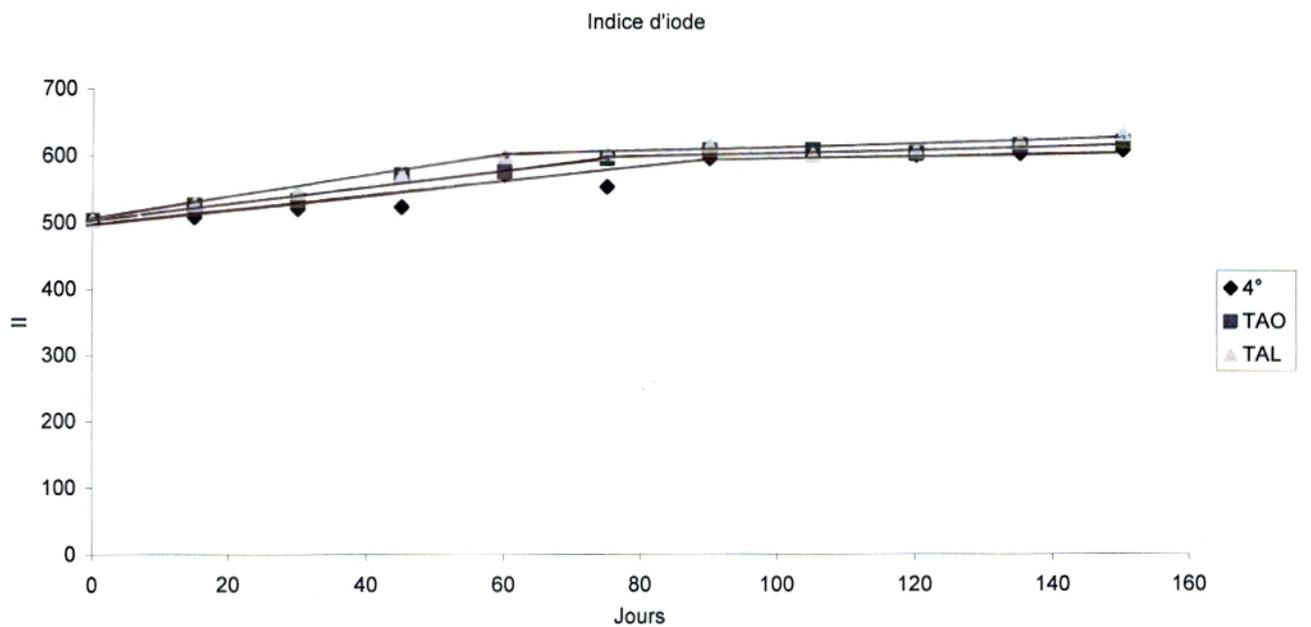


Figure 13 : Courbe de variation de l'II de l'HE du *Thymus fontanesii*

4° : HE conservée à 4°C ;

TAO : HE conservée à la température ambiante à l'ombre,

TAL : HE conservée à la température ambiante et exposée à la lumière.

2. Interprétation des résultats :

Huile essentielle du laurier :

↘ L'acidité est une des données importantes qui déterminent la qualité au départ de l'huile essentielle et permet de suivre son évolution par la suite. Les valeurs de l'indice d'acide des deux échantillons d'huile essentielle conservés à la température ambiante augmentent au cours du temps par rapport à celle de l'huile fraîchement extraite qui est de **2.244** jusqu'à atteindre un maximum de **8,976** pour l'huile conservée à l'abri de la lumière et **10,09** pour l'huile qui a été exposée à la lumière et ce après 150 jours de conservation. Alors que l'indice d'acide de l'huile conservée à 4°C a subi une légère variation par rapport aux autres échantillons, en augmentant de **2.244** pour l'huile fraîchement extraite jusqu'à atteindre la valeur de **6,581** au 150^{ème} jour.

↘ L'indice d'ester des huiles conservées à la température ambiante varie en augmentant de **22.44** pour l'huile fraîchement extraite jusqu'à atteindre la valeur de **224,4** au 150^{ème} jour pour l'huile conservée à l'abri de la lumière et **252,45** pour l'huile qui a été exposée à la lumière. Tandis que l'IE d'huile conservée à 4°C n'a subi qu'une légère augmentation passant de **22.44** jusqu'à **112,2** pendant la même durée de la conservation.

L'augmentation de cet indice pour les deux échantillons conservés à la température ambiante n'est pas aussi régulière, car nous remarquons sa diminution au **J75** pour les 2 échantillons et au **J90** pour celui qui a été exposé à la lumière. Cette diminution se traduit par une augmentation de l'indice d'acide dans les deux cas.

↘ Pour les 3 échantillons, l'indice de peroxyde a évolué d'une façon irrégulière (en dents de scie) au cours de la durée de la conservation. A 4°C, il augmente de **9600** pour l'huile fraîchement extraite jusqu'à atteindre une valeur de **20480** au 105^{ème} jour, là où il commence à diminuer jusqu'à atteindre la valeur de **11200** au 135^{ème} jour, ensuite il augmente jusqu'à **15680** à la fin de la conservation.

L'indice de peroxyde de l'huile conservée à la température et à l'abri de la lumière, augmente de **9600** jusqu'à **19200** au 75^{ème} jour, il diminue au 90^{ème} jour, ensuite il commence à augmenter jusqu'à atteindre un maximum de **25600** au 150^{ème} jour. Tandis que l'augmentation de cet indice pour l'huile exposée à la lumière s'arrête au 60^{ème} jour, il diminue au 75^{ème} jour, ensuite il augmente jusqu'à atteindre un palier de **27200** au 150^{ème} jour.

↘ L'indice d'iode augmente au cours du temps, en passant de **418.77** pour l'huile fraîchement extraite jusqu'à **609.12** au 60^{ème} jour pour l'huile conservée à 4°C. Alors que l'indice d'iode de l'huile conservée à la température ambiante à l'abri de la lumière et de celle qui a été exposée à la lumière, se stabilise après 30 jour, il arrive à des valeurs maximales de **664.83 (TAO)** et **667.5 (TAL)**.

Huile essentielle du thym :

→ L'indice d'acide des huiles conservées à la température ambiante augmente pendant toute la durée de la conservation de **1.458** pour l'huile fraîchement extraite jusqu'à atteindre la valeur de **6,62** au 150^{ème} jour pour l'huile conservée à l'abri de la lumière et **6,95** pour l'huile exposée à la lumière. Tandis que l'indice d'acide d'huile conservée à 4°C a subi une augmentation passant de **1.458** jusqu'à **5,161** pendant les 150 jours de conservation.

→ L'IE de l'huile fraîchement extraite est de **16.83**. Cette valeur a augmenté jusqu'à atteindre un maximum de **280,5** pour l'huile conservée à la température ambiante et à l'abri de la lumière et de **308,95** pour l'huile conservée à la température ambiante et exposée à la lumière. Alors que pour l'huile conservée à 4°C, cet indice n'a augmenté que légèrement par rapport aux autres échantillons passant de **16.83** jusqu'à atteindre un palier de **123,42** au 150^{ème} jour.

Dans ce cas aussi l'augmentation n'est pas régulière pour les deux échantillons conservés à la température ambiante. L'IE a diminué au **J45** pour l'huile conservée à l'abri de la lumière, et aux **J60, J75 et J120** pour celle qui a été exposée à la lumière. Cette diminution se traduit toujours par une augmentation remarquable de l'indice d'acide.

→ L'indice de peroxyde des 3 échantillons, n'augmente pas d'une façon remarquable à la fin de la conservation. Il passe de **8000** pour l'huile fraîchement extraite jusqu'à atteindre un maximum de **27200** au 45^{ème} et 60^{ème} jour pour l'huile conservée à l'abri de la lumière et celle exposée à la lumière, respectivement, et un maximum de **19200** au 75^{ème} jour pour celle conservée à 4°C. Ensuite il commence à diminuer et augmenter jusqu'à atteindre les valeurs suivantes au 150^{ème} jour : **8800** pour l'huile conservée à 4°C, **9600** pour l'huile conservée à l'abri de la lumière et **12000** pour celle exposée à la lumière.

→ L'II augmente au cours du temps en passant de **502.524** pour l'huile fraîchement extraite jusqu'à atteindre une valeur de **601.5** au 60^{ème} jour pour l'huile exposée à la lumière, et une valeur de **596.43** au 75^{ème} jour et 90^{ème} jour pour l'huile conservée à la température ambiante à l'abri de la lumière et celle conservée à 4°C, respectivement. Ces valeurs commencent à se stabiliser et convergent vers des valeurs très proches au 150^{ème} jour.

Nous pouvons attribuer l'évolution des indices au cours du temps pour les huiles conservées à température ambiante aux variations de la température puisque la durée de la conservation était entre le mois de Mars et le mois de Juillet là où la température augmente d'une façon remarquable ce qui peut provoquer l'évaporation des fractions les plus volatiles à chaque prélèvement ;

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenu par **Daoudi A. et Djebbari F. (2003)** concernant le suivi des indices d'acide et de peroxyde de l'huile essentielle du *Thymus ciliatus* au cours du temps et en fonction de leur conservation. On remarque qu'ils augmentent au 20^{ème} jour, sauf pour celle conservée à température très basse (-18°C).

Les résultats de **Benladghem R. et Otmani Z. (2006)** montrent que l'indice d'acide de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii* a augmenté après 3 mois de conservation, par contre l'indice d'ester a diminué. La diminution de l'indice d'ester après 90 jours de conservation est un résultat contradictoire avec le nôtre (**Tableau 27**).

Pour l'huile essentielle du laurier, les résultats de **Benmoussat M., Chikh I. (1996)** et **Sari H. (2003)** ont montré que l'indice d'acide augmente légèrement à 4°C.

Le suivi des indices d'ester et de peroxyde par **Sari H. (2003)**, montre que ces indices augmentent au cours du temps (50 jours) pour les huiles conservées à 4°C et à 27°C mais d'une façon remarquable pour celle conservée à 27°C (**Tableau 28**).

Espèces	Conservation	J0			J20			J90		Références
		IA	IP	IE	IA	IP	IE	IA	IE	
<i>Thymus ciliatus</i>	Flacon fumé fermé (F.f.f) à 18°C	3.0855	16000		4.888	22400				Daoudi A. et Djebbari F., 2003
	F.f.f à 30°C				6.972	23400				
	F.f.f à -18°C				3.0855	16000				
	F transparent f à 18°C				6.391	28800				
	F.f. ouvert				7.553	32000				
<i>Thymus fontanesii</i>	A l'abri de la lumière et à T° basse.	0.25		2.99				0.405	2.1	Benladghem R., Otmani Z., 2006

Tab. 27 : Le suivi des indices chimiques des huiles essentielles du *Thymus ciliatus* et du *Thymus fontanesii* au cours du temps et en fonction de leur conservation obtenu aux travaux antérieurs.

	Température	IA			IE			IP		
		J0	J20	J50	J0	J20	J50	J0	J20	J50
<i>Laurus nobilis</i>	4°C	1.683	2.244	2.805	43.197	46.07	57.13	6400	8000	8400
	27°C		2.805	3.127		55.40	81.435		14400	44800

Tab. 28 : Le suivi des indices chimiques de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* au cours du temps et en fonction de sa conservation obtenu par Sari H. (2003).

3. Conclusion :

Comme attendu :

- L'indice d'acide augmente de façon conséquente pour l'échantillon conservé à la lumière et aux fluctuations de la température. A un degré moindre la même remarque est à faire pour l'échantillon conservé à l'abri de la lumière ;
- Les indices d'ester et de peroxyde évoluent de la même manière que l'indice d'acide. Néanmoins ce dernier augmente de façon plus ou moins irrégulière « en dents de scie » ;
- On constate une augmentation peu sensible pour l'indice d'iode qui fini par se stabiliser pour l'ensemble des échantillons des deux huiles entre 60 et 70 jours.

Les indices chimiques ne varient que légèrement lorsque l'huile est conservée à l'abri de la lumière et à une température basse (4°C). Résultat confirmé par plusieurs auteurs en particulier par **Pibiri M.C. (2006)** : « Les huiles essentielles sont stables aux basses températures si elles sont conservées de manière adéquate : à l'abri de l'oxydation et de la polymérisation provoquée par l'air, par la lumière ».

Etude Du Pouvoir Antimicrobien Des Huiles Essentielles

I. Introduction :

Si l'on consulte la littérature, sources scientifiques et vulgarisation confondues, presque toutes les huiles essentielles sont mentionnées au moins une fois pour un quelconque effet antimicrobien. Une sélection est alors assez difficile. C'est pourquoi nous avons établi des critères afin d'établir notre choix parmi les huiles essentielles répertoriées.

- L'activité est soit scientifiquement prouvée et décrite dans la littérature, soit présumée par sa composition ;
- Les plantes sont facilement disponibles ;
- Les rendements à l'extraction sont si possible élevés.

II. Les huiles essentielles testées :

1. Huiles essentielles :

Nous avons testé l'activité de deux huiles essentielles de sources et de familles différentes, huile essentielle du thym et celle du laurier. Les huiles essentielles sont conservées dans des petits flacons, à 4°C et à l'abri de la lumière.

2. Disques pour aromatogrammes :

Pour la méthode d'aromatogramme, les supports des huiles essentielles sont des disques de papier filtre, de 0.6 cm de diamètre est, ce qui correspond à un disque de 0.28 cm² de surface.

3. Emulsifiants :

Pour la méthode de contact direct nous avons utilisé comme émulsifiants des huiles essentielles :

- **Le tween 80** pour les bactéries ;
- **L'agar 0.1%** pour les champignons (**114**).

Il est à noter que le Tween 80 est inactif à des concentrations inférieures à 10% (**23**).

III. Les souches microbiennes :

Les souches pathogènes utilisées sont parmi celles qui causent les maladies courantes. Ce sont aussi des contaminants fréquents provoquant des infections importantes (comme les moisissures).

1. Origine :

Souches utilisées			Origine	
Bactéries	Gram négatif	Bacilles	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Laboratoire de microbiologie, Tlemcen
			<i>Enterobacter cloacae</i>	
		Coccies	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Laboratoire de microbiologie, Tlemcen (M ^r Drissi)
			<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	Gram positif	Bacilles	<i>Bacillus cereus</i> (S53)	Laboratoire de microbiologie, Tlemcen (M ^{me} Malek)
		Coccies	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Laboratoire de microbiologie, Tlemcen
			<i>Staphylococcus aureus</i> (S3)	Laboratoire de microbiologie, Tlemcen
Champignons	filamenteux		<i>Penicillium spp</i> BT2	Laboratoire de mycologie, Tlemcen (M ^r Moussaoui)
			<i>Aspergillus niger</i> BDB5	
			<i>Aspergillus flavus</i> O2	
			<i>Fusarium oxysporum</i> F16	
			<i>Rhizopus stolonifer</i> O1	
	Non filamenteux		<i>Candida albicans</i> 444IPP	Laboratoire de microbiologie, Tlemcen

Tab. 29 : Provenance des germes étudiés.

2. Conservation : Les souches bactériennes et fongiques ont été conservées à 4°C, dans la gélose nutritive inclinée pour les bactéries, le milieu Sabouraud inclinée pour *Candida albicans* et la gélose PDA inclinée pour les champignons filamenteux.

3. Préparation des inoculums :

- *Les bactéries :* les souches sont revivifier dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24h, puis ensemencées en strie sur boîte contenant de la gélose nutritive et incubées à 37°C/24h. Ensuite, les souches microbiennes sont ensemencées sur bouillon BHIB à 37°C pendant 18h.
- *Les levures :* les souches sont revivifier dans un bouillon nutritif à 30°C pendant 48h, puis cultivées sur boîte contenant du milieu Sabouraud pendant 24h à 48h. Ensuite elles sont cultivées dans du bouillon nutritif pendant 24h à 48h.
- *Les moisissures :* elles proviennent d'une culture de 2 à 7 jour en boîte de pétri contenant du milieu PDA acidifié.

4. Concentration cellulaire des Inoculums :

La concentration bactérienne ou fongique (*Candida albicans*) des inoculums est évaluée par turbidité et est exprimée par la mesure de la Densité Optique (DO à 600 nm) sur un spectrophotomètre.

5. Vérification de la pureté des souches bactériennes :

La vérification de la pureté des souches bactérienne a été effectué par :

- › Observation à l'état frais ;
- › Observation de l'aspect des colonies ;
- › Coloration de Gram ;
- › Mise en évidence des enzymes respiratoires catalase et oxydase.

IV. Les milieux de culture :

Les différents milieux de culture solides et liquides sont décrits dans l'Annexe. Nous avons principalement utilisé :

- › Pour les bactéries : la gélose nutritive, le bouillon nutritif, le BHIB, le milieu Mueller- Hinton.
- › Pour les levures : le bouillon nutritif et le milieu Sabouraud.
- › Pour les champignons : le milieu PDA et le milieu PDA acidifié.

V. Les méthodes utilisées :

Le principe et la description de chaque méthode sont décrits dans l'Annexe.

Méthodes	Milieu	Utilisée pour	Inoculum	Incubation	Lecture
Méthode de Vincent (technique de l'aromatogramme)	solide	bactéries	10 ⁶ UFC/ml	37°C/ 18-24h	Mesure du diamètre d'inhibition.
		levures		35°C/ 24-48h	
Méthode de contact direct	Solide	Champignons filamenteux	Disque d'agar de 6mm, couvert de mycélium	25°C/ 2 à 7 jours	Mesure du diamètre de la prolifération
		Bactéries	10 ⁴ UFC/ml	37°C/ 18-24h	Présence ou absence de la croissance bactérienne
	Liquide	Bactéries	10 ⁸ UFC/ml		Présence ou absence de la turbidité
Nature de l'activité antibactérienne	Solide	Bactéries	Disque d'agar de 6mm, prélevé de la zone d'inhibition	37°C/ 18-24h	Présence ou absence de la croissance bactérienne

Tab. 30 : Les méthodes utilisées dans l'étude du pouvoir antimicrobien de nos huiles essentielles.

VI. Expression des résultats :

1. Vérification de la pureté des souches bactériennes :

Les résultats de cette vérification montrent que nos souches sont pures (Tableau 31).

Caractéristiques souches	Aspect des colonies	Etat frais	Coloration de Gram	Catalase	Oxydase
<i>Escherichia coli</i>	Petites colonies opaques arrondies et luxuriantes (rouge)	Mobile Bacille	-	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	Colonies brillantes, opaques, aspect assez gros (rouge)	Mobile Bacille	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonies plates, surface transparente	Mobile Bacille	-	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Colonies bombées blanchâtres	Mobile Bacille	-	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Colonies sphériques	Immobile Cocci	-	+	-
<i>Bacillus ce.</i>	Colonies ayant des formes irrégulières avec des bords ondulés.	Mobile Bacille	+	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> Sa	Colonies opaques bombées (dorées)	Immobile Cocci	+	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> S ₃					

Tab. 31 : Résultats de la vérification de la pureté des souches bactériennes.

2. Etude de l'effet antibactérien des huiles essentielles du *Thymus fontanesii* et du *Laurus nobilis* :

En bactériologie médicale chaque souche est caractérisée par deux valeurs : le diamètre d'inhibition établi selon la méthode de Vincent, et la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) établie selon la méthode de référence par dilution en milieu gélosé ou en milieu liquide.

2-1. Méthode de Vincent :

Les résultats des aromagrammes sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions, en cm ou mm (47) ; (51) ; (58) ; (91) ; (104) ; (144) ; (145).

Selon **Belaiche**, Cette mesure est transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité 0, ±, +, ++, +++ (Tableau 32).

INHIBITION*	TRANSCRIPTION	SENSIBILITE
0	0	Résistant
0,5 cm	±	Peu sensible
1 cm	+	Sensible
2 à 3 cm	++	Assez sensible
> 3 cm	+++	Très sensible

* valeur du diamètre du disque imbibé soustraite

Tableau 32 : Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition pour des disques imprégnés de 10 µl d'huiles essentielles (8).

Pour chaque test réalisé, le nombre de croix « + » obtenu par type d'huile essentielle est additionné. Ce nombre est comparé au résultat hypothétique d'une activité maximale de « +++ » pour toutes les mesures, calculé pour un même nombre d'essais.

La quantité d'huiles essentielle sur le disque varie selon les auteurs, excluant toute comparaison des valeurs des diamètres mesurés. Nous avons listé les différentes quantités mentionnées dans les études suivantes :

- 30 µl (30) ;
- 25 µl (145) ;
- 15 µl (28), (51) ;
- 10 µl (8), (47), (104) ;
- 5 µl (123), (144) ;
- 4 µl (91), (127) ;
- 3 µl (58) ;
- 2 µl (127).

Le tableau suivant représente les quantités d'huiles essentielles que nous pouvons déposer dans des disques pour aromagramme de 6mm de diamètre :

Quantité d'huile essentielle déposée	Références
2-3 μ l	(85)
2.5-5 μ l	(143)
20 μ l	(116)

Tab. 33 : Quantités d'huiles essentielles déposées dans des disques pour aromagramme de 6mm de diamètre.

Dans notre travail, et pour un premier essai, nous avons imprégnés 3 disques de 10 μ l d'huiles essentielles par boîte de pétri. Après 18 h d'étuve, nous avons mesuré les zones d'inhibitions. Les résultats sont transcrits dans différents symboles selon **Belaiche P. (1979)**, et sont mentionnés dans le tableau suivant :

Souches	HE du laurier			HE du thym		
	Diamètre d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité	Diamètre d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 (diamètre du disque)	0	Résistant	18	+	Sensible
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6	0	Résistant	15	+	Sensible
<i>Enterobacter cloacae</i>	Ø	+++	Très sensible	Ø	+++	Très sensible
<i>Escherichia coli</i>	23	++	sensible	Ø	+++	Très sensible
<i>Acinetobacter baumannii</i>	17	+	Sensible	Ø	+++	Très sensible
<i>Bacillus cereus</i>	21	++	sensible	Ø	+++	Très sensible
<i>Staphylococcus aureus</i> Sa	20	++	sensible	Ø	+++	Très sensible
<i>Staphylococcus aureus</i> S ₃	20	++	sensible	Ø	+++	Très sensible

Tab. 34 : Les diamètres des zones d'inhibitions des différentes souches (en mm) selon la méthode de Vincent (pour 10 μ l d'huiles essentielles).

Ø : boîte translucide.

Diamètre du disque inclus.

Pour l'huile essentielle du thym, la majorité des boîtes gélosées sont translucides sauf celles ensemencées par *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*. Les zones d'inhibition de ces boîtes translucides peuvent être même supérieures au diamètre de la boîte de pétri.

Alors que pour l'huile essentielle du laurier, les diamètres sont en général mesurables et importants (17 à 23mm) sauf pour celui d'*Enterobacter* dont la boîte était translucide.

Donc, cette quantité d'huile essentielle nécessite des boîtes de pétri plus grandes.

Nous avons effectué par la suite un deuxième essai, en déposant **3 µl** d'huiles essentielles sur chaque disque. Les résultats sont mentionnés dans le tableau suivant :

Souches	Diamètres d'inhibition (mm)	
	HE du laurier	HE du thym
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	8-9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6	9
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	17
<i>Escherichia coli</i>	8-9	20
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8	>30 (34)
<i>Bacillus cereus</i>	8-13	20-25
<i>Staphylococcus aureus</i> Sa	10	25-30
<i>Staphylococcus aureus</i> S ₃	9	>30 (31)

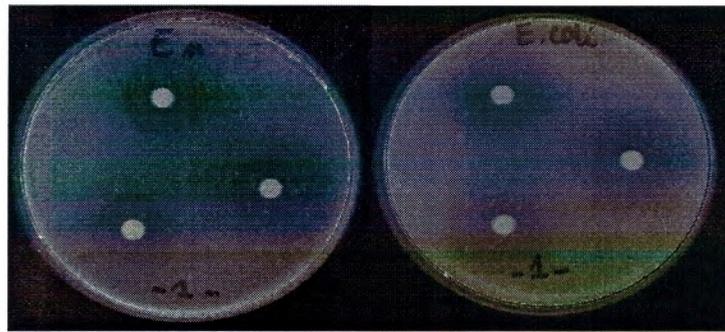
Tab. 35 : Les diamètres des zones d'inhibitions des différentes souches (en mm) selon la méthode de Vincent (pour 3 µl d'huiles essentielles).

Dans ce cas, les diamètres sont compris entre 6-34mm. Ces diamètres sont raisonnablement compris dans les 90mm de la boîte de pétri.

3 µl est donc la quantité d'huile essentielle qui est choisie pour nos expériences.

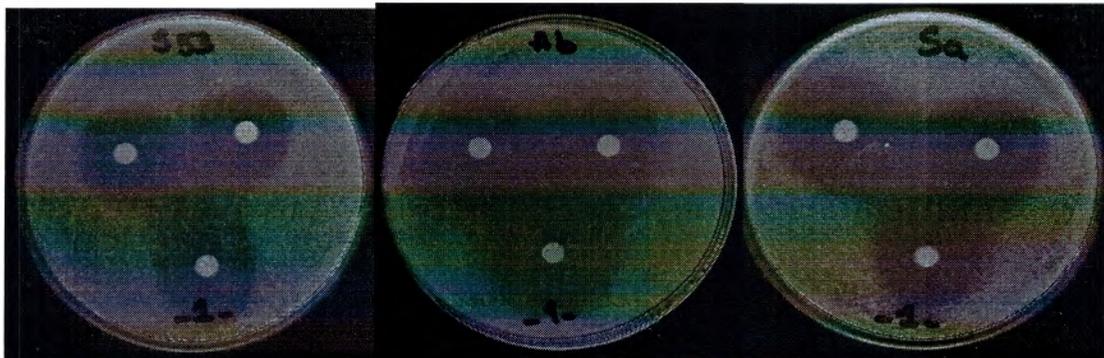
Nous constatons que l'huile essentielle du thym s'est avérée plus active par rapport à celle du laurier et que *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* présentent une résistance à ces deux huiles. Pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ce comportement n'est pas surprenant car elles possèdent une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides, associée à la nature de sa membrane externe. Cette barrière « hydrophilic permeability barrier » protège des agents toxiques. Composée de liposaccharides, elle peut être franchie plus facilement en présence de certains composés polycationiques qui augmentent la perméabilité des bactéries Gram négatif (**108**).

Les autres souches se comportent différemment avec des diamètres compris entre 17 et 34mm pour l'huile essentielle du thym et entre 7 et 13mm pour l'huile essentielle du laurier.



1

2



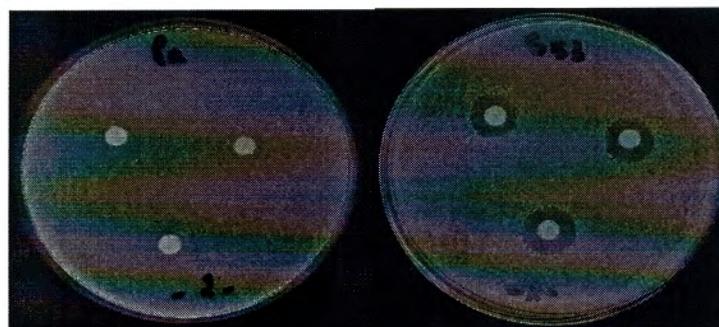
3

4

5

- 1 : *Enterobacter cloaceae*
- 2 : *Escherichia coli*
- 3 : *Bacillus cereus*
- 4 : *Acinetobacter baumannii*
- 5 : *Staphylococcus aureus* Sa

Les aromatoigramme de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii*



7

8

- 7 : *Pseudomonas aeruginosa*
- 8 : *Bacillus cereus*

Les aromatoigramme de l'huile essentielle du *Laurus nobilis*

Certains résultats obtenus semblent en contradiction avec certaines données de la littérature.

L'huile essentielle du laurier noble est mentionnée selon **Zimmermann E. (1998)** comme une huile antibactérienne. Alors que notre huile de la même espèce n'a pas montré une activité intéressante vis-à-vis de toutes les souches bactériennes étudiées.

La faible activité de cette huile essentielle lors de nos essais est peut être due soit au fait que la quantité déposée sur les disques est insuffisante puisqu'elle a donné des diamètres plus importants avec 10µl, soit à sa composition chimique qui est dépourvue de composés phénoliques qui sont les plus efficaces devant les monoterpénols (terpinen-4-ol, linalol, géraniol...) et les monoterpènes (pinènes, limonènes...) selon **Dorman H.J.D. et al. (2000)**.

Pour les diamètres les plus élevés nous avons défini un coefficient d'activité **A (128)** :

$$A = a / q \quad \text{avec} \quad a = \pi (d^2 / 4)$$

Où :

a : la surface d'inhibition ;

q : la quantité de l'huile essentielle déposée (en µl)

d : le diamètre d'inhibition (cm), diamètre du disque imbibé inclus.

Souches	HE du thym	
	surface d'inhibition a (cm ²)	Coefficient d'activité A (cm ² /µl)
<i>Escherichia coli</i>	3.14	1.04
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9.07	3.02
<i>Bacillus cereus</i>	5	1.66
<i>Staphylococcus aureus</i> Sa	7	2.33
<i>Staphylococcus aureus</i> S ₃	7.5	2.5
<i>Enterobacter cloacae</i>	2.26	0.75

Tab. 36 : Les surfaces d'inhibition des différentes souches et les coefficients d'activité de l'huile essentielle du thym.

La plus grande surface d'inhibition était dans le cas d' *Acinetobacter baumannii*, suivi par les 2 souches de *Staphylococcus aureus*. Ces espèces sont donc les plus sensibles à l'huile essentielle du *Thymus fontanesii*.

Pibiri M.C. (2006), a vérifié la relation entre la surface d'inhibition et la quantité d'huile essentielle déposée sur le disque pour 5 huiles y compris l'huile essentielle du thym à thymol. Ses résultats montrent que pour une quantité de **3 µl** de cette huile, la surface d'inhibition pour *Staphylococcus aureus* est de 20 cm² avec une activité de 6.5. Nos résultats pour la même espèce sont largement inférieurs.

Les tableaux **37** et **38** résument les résultats obtenus dans les travaux antérieurs sur l'effet antibactérien des huiles essentielles du laurier et du genre *Thymus*.

Les résultats obtenus par **Biondi D. et al. (1993)** et **Pibiri M.C. (2006)** montrent que l'huile essentielle du laurier est quasi inactive contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats sont en accord avec les nôtres. Alors que dans l'étude réalisée par **Sari H. (2003)** pour la même plante originaire de Tlemcen, les diamètres sont plus importants que les nôtres pour les deux souches de référence de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* et pour une souche d'*Escherichia coli*. Ainsi, cette huile est inactive contre 2 autres souches de *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Malheureusement, notre étude ne mentionne pas la composition exacte en phénols de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii*, ce qui exclu toute comparaison sérieuse avec d'autres résultats publiés.

Pour *Staphylococcus aureus*, des aromagrammes ont été réalisés avec différentes espèces endémiques de Thym portugais, dont les composés majoritaires sont le linalol et le 1,8-cinéol (**58**). Les diamètres d'inhibition (pour 3 µl d'huiles essentielles) varient entre 6 mm (le diamètre du disque) et 15 mm pour l'espèce la plus active. Ces résultats montrent que la présence de phénols, thymol ou carvacrol, augmente drastiquement l'activité des huiles essentielle de même espèce pour une même souche.

Toutes les espèces du Thym citées dans le tableau **38** sont actives sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et inactives sur *Pseudomonas aeruginosa* sauf à des concentrations élevées.

Pour ces 3 souches, nos résultats sont proches de ceux obtenus par **Janssen A.M. et al. (1986)** pour l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* et par **Pibiri M.C. (2006)** pour celle du thym à thymol.

Alors que les résultats obtenus par **Laredj H. (2004)**, montrent que l'activité de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* est plus intéressantes que celle de notre huile, et ceci vis -à- vis des souches d'*Escherichia coli* et d'*Acinetobacter sp.*

Les résultats d'une étude réalisée par **Bouhdid S. et al. (2006)** sur l'activité des huiles essentielles de 3 espèces du thym par la technique de diffusion en puits (**50µl**) montrent que les trois huiles sont inactives face aux trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* testées.

	<i>Thymus satureioides</i> à Bornéol (Maroc)	<i>Thymus vulgaris</i> à Thymol (France)	<i>Corydanthus capitatus</i> à Carvacrol (Espagne)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IH	8	8	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 110T	8	8	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 118	8	8	8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CECT 378	11	12	11
<i>E coli</i> K12	23	20	13
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 794	20	24	15

Diamètre (mm) du puit inclus

Quantité d'HE ou de la dilution	HE du laurier				
	10 µl			2-4 µl	3 µl
	1 : 2	1 : 5	1 : 10	Non diluée	
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 (s)	7(-)	-	6	14
<i>Escherichia coli</i> *	7(-)	-	-	Test non réalisé	0
					16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	/	/	/	/	22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	7	0
Références	Biondi D. et al. (1993)			Pibiri M.C. (2006)	Sari H., 2003

(s) : bactériostatique, (-) : activité non détectée, - : pas de zone d'inhibition.

* Dans l'étude de **Sari H.**, il y avait 2 souches d' *Escherichia coli*.

Tab. 37 : Comparaison des diamètres d'inhibition avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs pour l'huile essentielle du laurier.

Quantités (µl)	Thymus ciliatus								Thymus vulgaris			Thym à thuyanol	Thym à linalol	Thym saturéioides	Thym à thymol	
	10								3		2.5	10	2-4			4
dilution	1 :2 (V/V)	1 :5	1 :10	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml	5000 µg/ml								
<i>Staphylococcus aureus</i>	24 (c)	20 (c)	16 (c)	-	-	11.5	15.7	18.2	32.25		25-56	15.2	6	7-15	16-25	57
<i>Escherichia coli</i>	25 (c)	18 (c)	16 (c)	-	12	14	18.5	20.2	15.25	8.3	15-20	26.7	Tests non réalisés			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	12	14.7	18.7	23.1	7.25		6-10	10.3	7	6	6	6
<i>Enterobacter cloacae</i>									24							
<i>Pseudomonas fluorescens</i>										0						
<i>Pseudomonas aeruginosa (ambulatoire)</i>										0						
<i>Pseudomonas aeruginosa (Orthopédie)</i>										10.4						
<i>Pseudomonas aeruginosa (Reanimation)</i>										8.4						
<i>Acinetobacter sp</i>										9.5						
Références	Biondi D. et al. (1993) -Thym de la Sicile-			Kandil O. et al. (1994) -Thym d'Egypte-					Otsmani K., Kara A. (2002)	Laredj H. (2004)	Janssen A.M.etal (1986)	Piccaglia R.etal (1993)-Thym d'Italie-	Pibiri M.C. (2006)			

(c) : bactéricide, - : pas de zone d'inhibition.

Tab. 38 : Comparaison des diamètres d'inhibition avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs pour les huiles essentielles du Thym.

Nature de l'activité antibactérienne :

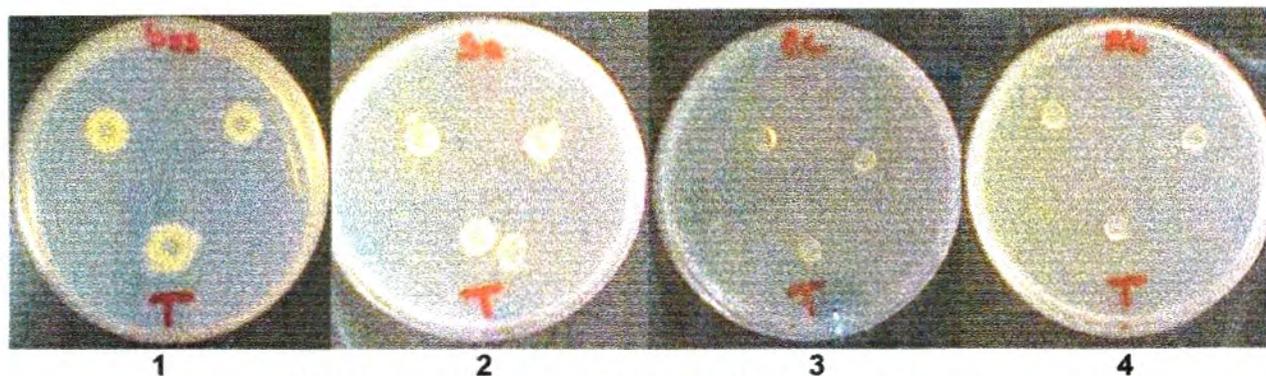
Pour toutes les souches dont les zones d'inhibition sont importantes, un prélèvement sur la surface de la gélose nutritive a été effectué. Les bactéries ont été incubées une deuxième fois et les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

Les souches	Huile essentielle du thym	
<i>Escherichia coli</i>	-	Bactéricide
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> Sa	++ (10mm)	Bactériostatique
<i>Staphylococcus aureus</i> S ₃	+ (7mm)	
<i>Bacillus cereus</i>	++ (13mm)	

Le diamètre du disque de la gélose inclus (6mm).

Tab. 39 : Nature de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du thym.

Nous constatons que l'huile essentielle du thym s'est montrée bactéricide contre les bactéries gram négatif et bactériostatique contre les bactéries gram positif.



Prélèvements sur la surface de la gélose nutritive.

- 1 : *Bacillus cereus*
- 2 : *Staphylococcus aureus* Sa
- 3 : *Escherichia coli*
- 4 : *Acinetobacter baumannii*

Nos résultats sont en accord avec l'affirmation de Zaika L.L. (1988) : « Les bactéries à Gram positif sont plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif ». Mais cette affirmation n'a cependant pas été confirmée par d'autres travaux.

Par contre, de nombreuses expériences (35 ; 46) ont confirmé que les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux huiles essentielles. Résultats en contradiction avec les nôtres.

► **Etude de l'effet antibactérien des huiles essentielles du *Thymus fontanesii* et du *Laurus nobilis* en fonction de leur conservation :**

Nous avons testé le pouvoir antibactérien des huiles essentielles conservées dans 3 conditions de stockage différentes pendant 150 jours vis-à-vis des souches citées précédemment afin de déterminer l'action antibactérienne de ces huiles essentielles en fonction du temps, de la température et de la lumière. Nous avons conservé les huiles essentielles à :

- 4°C dans des tubes fermés et à l'abri de la lumière ;
- Température ambiante dans des tubes fermés et à l'abri de la lumière ;
- Température ambiante dans des tubes fermés et transparents.

Les diamètres d'inhibition figurent dans les tableaux 40 et 41 :

3 µl de l'huile essentielle du Laurier				
Les souches	J ₀	J ₁₅₀		
		4°C	T° ambiante à l'abri de la lumière	T° ambiante exposée à la lumière
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	6	6	6
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6	6	6	6
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	7	7	7
<i>Escherichia coli</i>	8-9	8-9	8	8
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8	8	8-9	8
<i>Bacillus cereus</i>	8-13	11	8	8-10
<i>Staphylococcus aureus</i> Sa	10	10-12	7-8	7
<i>Staphylococcus aureus</i> S ₃	9	10-11	10	11

Tab. 40 : Suivi de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du laurier en fonction de temps et de sa conservation.

3 µl de l'huile essentielle du Thym				
Les souches	J ₀	J ₁₅₀		
		4°C	T° ambiante à l'abri de la lumière	T° ambiante exposée à la lumière
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8-9	8	8	9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9	7	7	7
<i>Enterobacter cloacae</i>	17	19	19	19
<i>Escherichia coli</i>	20	20	20	20
<i>Acinetobacter baumannii</i>	34	>35	31	30
<i>Bacillus cereus</i>	20-25	23	26	34
<i>Staphylococcus aureus</i> Sa	25-30	>35	34	30
<i>Staphylococcus aureus</i> S ₃	31	31	33	>35

Tab. 41 : Suivi de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du thym en fonction de temps et de sa conservation.

La comparaison entre les 4 échantillons des huiles essentielles du laurier et du thym nous a révélé presque les mêmes résultats. Nous pouvons conclure donc que la température et la lumière n'ont aucun effet sur l'efficacité des huiles essentielles. Pour les huiles conservées à 4°C, notre résultat est confirmé par le travail de **Bekhechi C. (2002)** pour une huile conservée pendant 20 mois.

2-2. Méthode de contact direct :

► En milieu solide :

Les bactéries dont les diamètres d'inhibition étaient importants sontensemencées en surface par spots dans des boîtes de pétri contenant le milieu **Mueller- Hinton** et les différentes concentrations d'huile essentielle du thym qui a montré une activité intéressante par la méthode de Vincent.

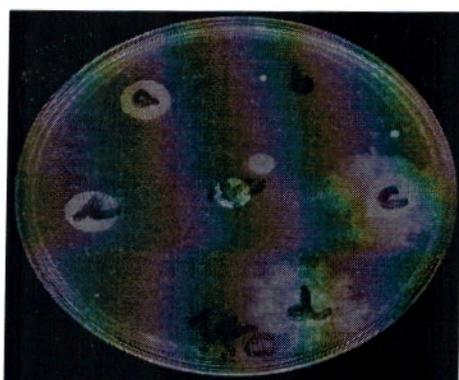
	SM	1/10	1/15	1/20	1/25	1/50	1/75	1/100	1/1000	1/10000
Volume d'HE dans chaque dilution (µl/10ml)	1000	100	66.6 6	50	40	20	13.33	10	1	0.1
Volume d'HE dans le milieu (µl/15ml)	150	15	10	7.5	6	3	2	1.5	0.15	0.015
Concentrations d'HE dans chaque dilution (mg/ml)	92.19	9.219	6.14 5	4.61	3.687	1.843	1.229	0.9219	0.09219	0.009219
Concentrations d'HE dans le milieu (µg/15ml)	138285	13828.5	9219	6914.25	5531.4	2765.7	1843.8	1382.85	138.28	13.82
Concentrations d'HE dans le milieu (µg/ml)	9219	921.9	614. 6	460.95	368.76	184.38	122.92	92.19	9.219	0.9219

Tab. 42 : Gamme de concentrations de l'huile essentielle du thym utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

Les résultats obtenus par la technique de contact direct en milieu solide sont représentés dans le tableau 43.

Dilutions Souches	T	SM	1/10	1/15	1/20	1/25	1/50	1/75	1/100	1/1000	1/10000
<i>Enterobacter cloacae</i>	++	-	-	±	+	+	++	++	++	++	++
<i>Escherichia coli</i>	++	-	-	-	-	-	±	+	+	++	++
<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++
<i>Bacillus cereus</i>	++	-	-	-	-	±	+	+	++	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i> Sa	++	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i> S ₃	++	-	-	-	-	±	+	+	++	++	++

Tab. 43 : Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* selon la méthode de contact direct.



Dilution 1/50

- a : *Enterobacter cloacae*
- b : *Escherichia coli*
- c : *Bacillus cereus*
- d : *Acinetobacter baumannii*
- e : *Staphylococcus aureus* Sa
- f : *Staphylococcus aureus* S₃

Méthode de contact direct (Huile essentielle de *Thymus fontanesii*)

Discussion :

Nous constatons la croissance de tous les germes dans le témoin (T), par contre il y a absence de la croissance de toutes les souches au niveau de la solution mère contenant 138285 µg d'huile essentielle dans le milieu et dans la dilution 1/10 contenant 13828.5 µg d'huile essentielle dans le milieu.

Ainsi, la sensibilité d' *Enterobacter cloacae* se situe entre les dilutions 1/10 et 1/15 et celle de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (S₃) se situe entre les dilutions 1/20 et 1/25, alors que la sensibilité de *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* et *Staphylococcus aureus* (Sa) se situe entre les dilutions 1/25 et 1/50.

Détermination des concentrations minimales inhibitrices : ces concentrations sont obtenus par la méthodes de contact direct en milieu gélosé (**Tableau 44**).

Souches	CMI (µg/ml)
<i>Enterobacter cloacae</i>	614.6 <CMI ≤ 921.9
<i>Escherichia coli</i>	184.38 <CMI ≤ 368.76
<i>Acinetobacter baumannii</i>	184.38 <CMI ≤ 368.76
<i>Bacillus cereus</i>	368.76 <CMI ≤ 460.95
<i>Staphylococcus aureus</i> Sa	184.38 <CMI ≤ 368.76
<i>Staphylococcus aureus</i> S ₃	368.76 <CMI ≤ 460.95

Tab. 44 : Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii* obtenues par la méthode de contact direct.

Discussion :

La souche d' *Enterobacter cloacae* est la plus résistante avec une CMI comprise entre 614.6 et 921.9 µg/ml. Les CMI des souches de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus* S₃ sont comprises entre 368.76 et 460.95 µg/ml, alors que les souches d'*Escherichia coli*, d' *Acinetobacter baumannii* et de *Staphylococcus aureus* Sa ont des CMI plus faibles qui sont comprises entre 184.38 et 368.76 µg/ml.

Donc l'huile essentielle du thym est très active sur l'ensemble des souches testées.

Souches	Thym à géraniol	Thym à linalol	Thym à α -terpinéol	Thym à thujanol 4	Thym à carvacrol	Thym à thymol	<i>Thymus fontanesii</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	250-2000	500-2000	500-2000	500-2000	250-1000	125-500	184.38 -368.76 (Sa)
							368.76 - 460.95 (S3)
<i>Escherichia coli</i>	500-1000	500-1000	330-2000	1000-2000	500-1000	125-500	184.38 -368.76
Références	Janssen A.M. et al., 1987						Nous mêmes

Tab. 45 : Comparaison des CMI ($\mu\text{g/ml}$) de notre huile essentielle du Thym avec celles déterminées pour 6 chemotypes de *Thymus vulgaris*.

Les CMI obtenues pour notre huile essentielle sont comprises dans les intervalles donnés par **Janssen A.M. et al. (1987)** pour le thym à thymol qui s'est montré le plus actif par rapport aux autres chemotypes et ceci pour les 2 souches citées dans le tableau 45.

• **En milieu liquide :**

Les bactéries sont ensemencées dans des tubes contenant le milieu BHIB et les différentes concentrations d'huile essentielles du thym.

Dans un premier essai nous avons utilisé le Tween 80 comme émulsifiant, mais nous n'avons pas pu lire les résultats à cause de la couleur blanche que donne le mélange huile essentielle- Tween 80 et qui gêne la lecture car elle masque la turbidité. Donc, nous avons changé l'émulsifiant en utilisant une solution d'eau- agar à 0.1% mais même ce dernier a donné une certaine turbidité.

Et vue que la lecture était par observation à l'oeil, donc elle était très difficile à faire et nous n'avons pas pu avoir des résultats précis même avec la spectrophotométrie car même les cellules mortes ont une densité.

3. Etude de l'effet antifongique des huiles essentielles du *Thymus fontanesii* et du *Laurus nobilis* :

L'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles du *Thymus fontanesii* et du *Laurus nobilis* a été réalisée sur une souche de *Candida albicans* par la méthode de Vincent (l'aromatogramme) et sur 5 souches de moisissures par la méthode de contact direct en milieu gélosé (PDA) en déposant un disque d'agar de 6mm couvert de mycélium (122) ; (146).

3-1. *Candida albicans* :

Nous avons testé le pouvoir antifongique des huiles essentielles fraîchement extraites (J₀) et après **150 jours** de conservation vis - à - vis d'une souche de *Candida albicans*. Ces huiles ont été conservées dans les mêmes conditions citées auparavant dans l'étude du pouvoir antibactérien au cours du temps et en fonction des conditions de la conservation (p 83).

Les résultats figurent dans le tableau 46 :

Les souches	3 µl de l'huile essentielle du Laurier			
	J ₀	J ₁₅₀		
		4°C	T° ambiante à l'abri de la lumière	T° ambiante exposée à la lumière
<i>Candida albicans</i>	18	19	20	22
	3 µl de l'huile essentielle du Thym			
	39	39	30	31

Tab. 46 : Les diamètres des zones d'inhibitions de la souche de *Candida albicans* (en mm) selon la méthode de Vincent.

Pour les quatre échantillons, les diamètres d'inhibition sont presque les mêmes, supérieurs à 30mm pour l'huile du Thym et aux environs de 20mm pour l'huile du Laurier.



Antifongogramme (*Candida albicans*) : HE du Thym conservée à 4°C pendant 150 jours.

Huile essentielle du	Diamètres d'inhibition (mm)			
	<i>Thymus fontanesii</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus ciliatus</i>	Thymol synthétique
<i>Candida albicans</i>	39	40.7	80	15
Références	Nous-mêmes	Janssen A. et al, 1986	Djelmoudi K. et Medjahedi K. (2001)	

Tab. 47 : Comparaison des diamètres d'inhibition de la souche de *Candida albicans* (en mm) avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs.

Djelmoudi K. et Medjahedi K. (2001) ont trouvé un diamètre d'inhibition beaucoup plus supérieur que le nôtre pour l'huile essentielle du *Thymus ciliatus*, alors que le résultat obtenu par Janssen A. et al (1986) pour l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* est proche au nôtre.

3-2. les champignons filamenteux :

La détérioration des produits alimentaires est causée principalement par les champignons appartenants aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium* (115). Ces espèces ont une importance sanitaire parce qu'elles élaborent les mycotoxines les plus dangereuses (16) qui peuvent provoquer un certains nombre de maladie telle que la mycotoxicose (126).

Nos huiles essentielles ont été testées contre 2 espèces d'*Aspergillus* (*A. niger* et *A. flavus*), *Penicillium sp.*, *Fusarium oxysporum* et *Rhizopus stolonifer*. La dernière espèce appartient à un genre très ubiquiste et sa présence en abondance témoigne d'une conservation dans les conditions médiocres (29).

* Gamme de concentrations des l'huiles essentielles utilisées pour l'évaluation de l'activité antifongique :

Dilutions	1/10	Pas de dilutions			1/100	1/1000
Volume d'HE dans chaque dilution (µl/10ml)	100				10	1
Volume d'HE dans le milieu (µl/20ml)	10	8	4	2	1	0.1
Concentration d'HE (µl/ml)	0.5	0.4	0.2	0.1	0.05	0.005
Concentrations d'HE dans le milieu (µg/ml)	460.95	368.76	184.38	92.19	46.09	4.609

Tab. 48 : Gamme de concentrations de l'huile essentielle du thym utilisée pour l'évaluation de l'activité antifongique.

Pas de dilutions (huile déposée directement dans le milieu)						
VOLUME d'HE dans le milieu ($\mu\text{l}/20\text{ml}$)	500	100	20	8	4	2
Concentration d'HE ($\mu\text{l}/\text{ml}$)	25	5	1	0.4	0.2	0.1
Concentrations d'HE dans le milieu ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	22897.5	4579.5	915.9	366.36	183.18	91.59

Tab. 49 : Gamme de concentrations de l'huile essentielle du laurier utilisée pour l'évaluation de l'activité antifongique.

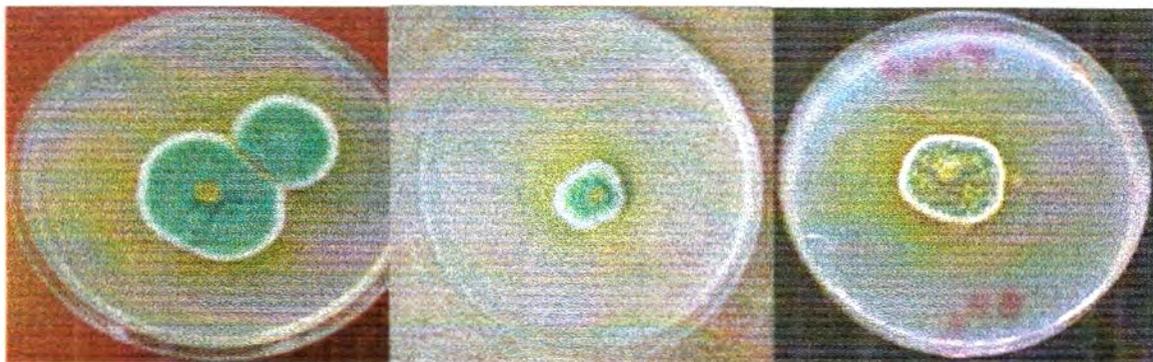
Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux 50 et 51.

Souches	Volume d'huile essentielle du thym (μl)									Durée d'incubation (jours)
	0 (T)	10	8	4	2	1	0.1			
<i>Fusarium oxysporum</i> F16	++ +	85mm	-	-	-	-	-	++	48.5mm	6
<i>Penicillium sp</i> BT2	++	40mm	-	-	-	-	-	+	26mm	7
<i>Aspergillus flavus</i> O2	++ +	90mm	-	-	-	-	-	+	28mm	
<i>Aspergillus niger</i> BDB5	++	54mm	-	-	-	-	-	+		
<i>Rhizopus stolonifer</i> O1	++ +	90mm	-	-	-	-	-	++	55.2mm	2

Tab. 50 : Pouvoir antifongique de l'huile essentielle du thym selon la méthode de contact direct.

Souches	Volume d'huile essentielle du laurier (μl)									Durée d'incubation (jours)
	0 (T)	500	100	20	8	4	2			
F16	+++	85mm	-	-	+	21mm	+	+	++	6
BT2	++	40mm	-	-	+	18.5mm	+ 20mm	+	+	7
O2	+++	90mm	-	+	+	28mm	++	++	+++	
BDB5	++	54mm	-	-	++	41mm	++	++	++	
O1	+++	90mm	-	-	++	40mm	++	++	+++	2

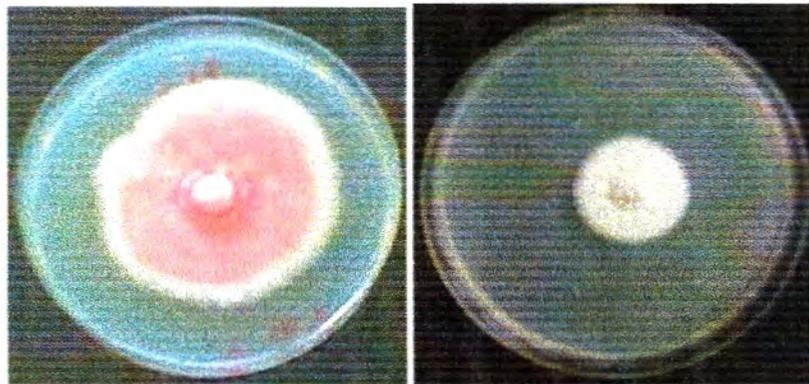
Tab. 51 : Pouvoir antifongique de l'huile essentielle du laurier selon la méthode de contact direct.



BT2 Témoin

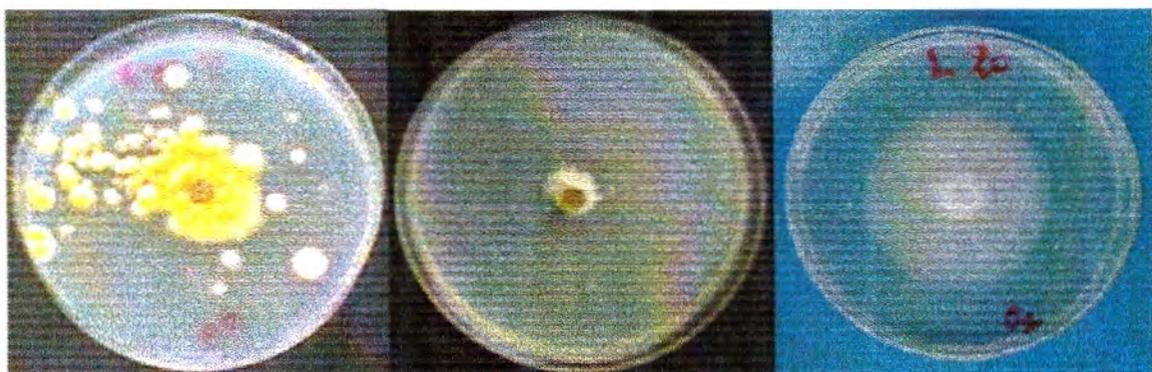
BT2 L20

BT2 T 1/1000



F16 T1/1000

F16 L20



O2 T1/1000

O2 L100

O1 L20

L20 : 20 µl HE du laurier dans le milieu ; L100 : 100 µl HE du laurier ; T1/1000: 0.1 µl HE du thym.
 BT2: *Penicillium sp.*; F16: *Fusarium oxysporum* ; O2 : *Aspergillus flavus* ; O1 : *Rhizopus stolonifer*.

Pouvoir antifongique des huiles essentielles du thym et du laurier selon la méthode de contact direct.

Les concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles étudiées sont comprises entre **0.005 µl/ml** et **0.05 µl/ml** pour l'HE du Thym contre la totalité des moisissures et entre **1 µl/ml** et **5 µl/ml** pour l'HE du Laurier contre toutes les moisissures à l'exception d'**Aspergillus flavus** pour laquelle la CMI est comprise entre **5 µl/ml** et **25 µl/ml**. Pour l'huile essentielle du **Thymus fontanesii** originaire de Djelfa et étudiée par **Dob T. et al., 2006**, la CMI est de **0.2µl/ml** contre le mucor « *Ramaniamus* ».

Quantités ou concentrations	HE du <i>Thymus vulgaris</i> (ppm)				HE du <i>Coridothymus capitatus</i> (µl/l)					
	0 (T)	200	500	600	3			4		
					3J	8J	14J	3J	8J	14J
<i>Fusarium moniliforme</i>	85	16.6±1	0	-						
<i>Aspergillus flavus</i>	84±2.2	-	6.3±1.2	-	23.5	30	50	20	35	40
<i>Aspergillus niger</i>					10	≈30	≈45	5	20	25
Références	Nguefack J. et al. (2004)				Paster N. et al. (1995)					

Tab. 52 : Comparaison du pouvoir antifongique de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii* par méthode de contact direct avec les travaux antérieurs.

A **5 µl/l** (dilution **1/1000**) de notre huile essentielle du *Thymus fontanesii*, le diamètre de la croissance d'**Aspergillus flavus** après 7 jours d'incubation est inférieur à ceux obtenus par **Paster N. et al. (1995)** après 8 jours d'incubation pour **3** et **4 µl/l** d'huile essentielle du **Coridothymus capitatus**. Donc, notre huile essentielle du Thym est plus efficace contre **Aspergillus flavus**.

HE du <i>Laurus nobilis</i>						
	1ml	0.5ml	SM (10 ⁻¹)	10 ⁻²	10 ⁻³	Durée d'incubation
<i>Fusarium</i>	0	25	60	80-90	80-90	5jours
<i>Penicillium</i>	0	0	0	80-90	80-90	
<i>Aspergillus flavus</i>	20	25	80-90	80-90	80-90	
<i>Aspergillus niger</i>	0	62	80-90	80-90	80-90	
<i>Rhizopus</i>	0	28	50	80-90	80-90	
Référence	Sari H., 2003					

Tab. 53 : Comparaison du pouvoir antifongique de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* par méthode de contact direct avec un travail antérieur.

En comparant ces résultats avec les nôtres, nous constatons que notre huile du Laurier est plus active que celle étudiée par **Sari H. (2003)** puisqu'elle inhibe totalement la croissance de toutes les moisissures étudiées à **0.5ml (500µl)** et même à **100µl** sauf pour **Aspergillus flavus**. Selon **Sari H. (2003)** cette espèce s'est montrée totalement résistante à cette concentration (dilution 10⁻¹), par contre sa prolifération était faible dans la même concentration de notre huile essentielle (11mm).

➤ **Les pourcentages d'inhibition :**

$$\text{Le pourcentage d'inhibition} = [(D1 - D2) / D1] * 100 \quad (146)$$

Avec **D1** : diamètre de la prolifération des champignons en absence de l'huile essentielle dans le milieu ;

D2 : diamètre de la prolifération des champignons en présence de l'huile essentielle dans le milieu.

Les pourcentages d'inhibition de nos huiles essentielles sont résumés dans le tableau 54.

L'inhibition totale de la croissance de toutes les moisissures étudiés nécessite une concentration $\geq 46.09 \mu\text{g/ml}$ pour l'huile essentielle du thym. A une concentration de $4.609 \mu\text{g/ml}$ le pourcentage d'inhibition d'*Aspergillus flavus* est important.

Pour l'huile essentielle du laurier il faut une concentration de $4579.5 \mu\text{g/ml}$ pour inhiber totalement la croissance de ces espèces à l'exception de *Aspergillus flavus* (87.77%). A une concentration de $915.9 \mu\text{g/ml}$ les pourcentages d'inhibition d'*Aspergillus flavus* et de *Fusarium oxysporum* sont très importants.

	$\geq 1\mu\text{l}$ d'HE du thym	$0.1\mu\text{l}$ d'HE du thym	$20\mu\text{l}$ d'HE du laurier	$100\mu\text{l}$ d'HE du laurier	$500\mu\text{l}$ d'HE du laurier
<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	42.94%	75.29%	100%	100%
<i>Aspergillus flavus</i>		68.88%	68.88%	87.77%	
<i>Rhizopus stolonifer</i>		38.66%	55.55%	100%	
<i>Aspergillus niger</i>			24.07%	100%	
<i>Penicillium</i>		35%	53.75%	100%	

Tab. 54 : Les pourcentages d'inhibition des huiles essentielles du thym et du laurier.

Nous constatons que l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* témoigne d'une activité antifongique intéressante et qu'elle est plus active par rapport à celle du laurier. Cette grande activité peut être reliée à la présence des composés phénoliques dans cette huile. Cependant, plusieurs études ont permis de conclure que d'autres constituants pourraient intervenir dans le pouvoir antifongique autres que le carvacrol, le thymol et leur précurseur le p- cymène (177) ; (178).

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par **Soliman k. M. et al. (2002)**, **Suhr K.I. et al. (2003)** et **Nguefack J. et al. (2004)** (Tableau 55), nous constatons que notre huile essentielle du *Thymus fontanesii* est plus active sur *Aspergillus flavus*.

	HE du <i>Thymus vulgaris</i> (ppm / 10ml du milieu)					HE du Thym à thymol (µl/l)					
	125	200	250	500	1000	250	135	270			
	Dans le milieu de culture					Microatmosphère					
<i>Aspergillus flavus</i>	88%	100%				≈70%	45%	100%	≈75%	100%	70%
		91.3% (500ppm)*				(7J)	(14J)	(7J)	(14J)	(7J)	(14J)
<i>Fusarium moniliforme</i>	94%	97.29 %*	100%								
Références	Soliman k. M. et al. (2002)					Suhr K.I. et al. (2003)					
	* Nguefack J. et al. (2004)										

Tab.55 : Comparaison des pourcentages d'inhibition des huiles essentielles du thym et du laurier avec deux travaux antérieurs.

4. Conclusion :

De ces résultats, nous pouvons conclure que l'huile essentielle du *Thymus fontanesii* est plus active que celle du *Laurus nobilis* sur tous les germes testés et que pour les deux huiles cette activité est plus importante sur les moisissures que sur les bactéries.

Cette conclusion est confirmée par de nombreuses études qui ont montré que les meilleures activités ont été observées par les huiles essentielles riches en composés phénoliques (Thymol, Carvacrol et Eugénol). Les membres de cette famille (Thym, Origan...) sont connus pour être, selon la concentration utilisée, bactéricides ou bactériostatiques :

- ◇ L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a une grande activité inhibitrice contre la majorité des microorganismes testés à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*, et un effet antifongique puissant contre les champignons filamenteux et les levures et sur la production de mycotoxine (142) ; (85) ; (129) ; (23) ; (24) ; (168) ; (114) ; (146) ; (172) ;
- ◇ L'huile essentielle de *Thymus capitatus* a une activité à la fois antibactérienne et antifongique contre les microorganismes testés (20) ; (89) ; (169) ;
- ◇ L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus broussonetii* est plus prononcée contre les champignons que les levures et les bactéries et pour tuer ces microorganismes il faut 2 fois plus de l'huile essentielle du thym que pour inhiber leur croissance (150) ;
- ◇ L'huile essentielle de *Coridothymus capitatus* testées par fumigation contre 3 espèces d'*Aspergillus* et contre la microflore des graines de blé, était moins efficace contre les mycéliums et fongistatique contre les spores (122) ;
- ◇ L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* originaire de l'Algérie (Djelfa) a montré une grande activité inhibitrice contre les bactéries gram négatif et une activité antifongique contre le mucor « *Ramaniamus* » (49).

Conclusion

Conclusion

Ce travail s'intéresse à caractériser deux espèces végétales par des tests phytochimiques et à étudier les propriétés physicochimiques et microbiologiques de leurs huiles essentielles. Il s'agit de **Laurus nobilis** de la famille des lauracées et de **Thymus fontanesii** de la famille des labiées, qui poussent à l'état sauvage dans les régions de Tlemcen (Nedroma) et de Mostaganem, respectivement.

L'étude phytochimique a permis de détecter les différentes familles de composées chimiques existantes dans les feuilles du laurier et du thym. L'épuisement des feuilles par cinq solvants de polarités différentes a révélé :

- La présence des tanins, des flavonoïdes, des saponosides et des huiles volatiles qui sont dotés d'activités pharmacologiques et toxicologiques, ainsi que des anthracénosides des stérols et stéroïdes, des sucres réducteurs et des acides gras dans les feuilles des deux plantes ;
- La présence des quinones libres, des alcaloïdes et des polyuronides dans les feuilles du laurier, des émодols et des anthraquinones dans les feuilles du thym ;
- L'absence totale des coumarines, des anthocyanosides et d'amidon dans les feuilles des deux plantes étudiées.

La présence des saponosides dans les feuilles des deux plantes est confirmée par le calcul de l'indice de mousse qui est supérieur à 100.

Les rendements en huiles essentielles du thym et du laurier obtenues par entraînement à la vapeur d'eau sont 2% et 1.2% respectivement. Ces rendements sont acceptables et peuvent être rentable à l'échelle industrielle.

Les rendements en extraits hydrosolubles contenus dans les hydrolats sont relativement très importants. Ils représentent 20 à 25 % des rendements en huiles essentielles. Ces hydrolats sont eux-mêmes des matériaux thérapeutiques précieux. Ils sont particulièrement appropriés pour les enfants et les personnes âgées.

Le contrôle de la qualité de nos huiles essentielles par des caractéristiques physicochimiques a permis de mettre en évidence la qualité de ces huiles qui ont une composition complexe, une acidité élevée et des indices physicochimiques comparables à ceux obtenus dans la littérature.

Le suivi des caractéristiques chimiques (IA, IE, IP, II) des huiles essentielles pendant 150 jours dans des conditions de conservations appropriées (4°C à l'ombre, température ambiante à l'ombre et en présence de la lumière) a montré une légère variation de ces indices lorsque l'huile est conservée à l'abri de la lumière et à basse température (4°C). Ces mêmes huiles se dégradent facilement lorsqu'elles sont conservées à température ambiante et à un degré moindre pour celles conservées à l'abri de la lumière.

- 1. **Abrassart J. L., 2001.** Aromathérapie essentielle (huiles essentielles et parfum pour le corps et l'âme). Guy Trédaniel Editeur - FLORILAB-.
- 2. **AFNOR NF T75-006, 1998.** Les huiles essentielles-vocabulaire-1ere liste.
- ✕ 3. **Agnihotri A., Khatoon S., Shanta M., 2003.** Pharmacognostical evaluation of an antioxidant plant-Acorus calamus linn. *Nat. Prod. Sci.* 9(4)264-269.
- 4. **Akrout A., 2001.** Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). Institut des régions arides.
5. **Ausloos P., 2002.** L'analyse des triangles : *laurus nobilis* et *Ravensara aromatica*. Suite de corps- Esprit- Emotion. Ed. Aromalves, Bruxelles.
- 6. **Ausloos P., 2002.** Les huiles essentielles : de l'histoire à l'industrie. Ed. Aromalves, Bruxelles.
- 7. **Bekhechi C., 2002.** Analyse de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* (Nûnkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien; Mémoire de Magister, BMC. Université de Tlemcen, faculté des Sciences.
- ✕ 8. **Belaiche P., 1979.** Traiter de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1, l'aromatogramme. p.137- 147. Maloine S. A. Editeur, Paris.
9. **Benabdallah S.A et Hassaine A., 2002.** Contribution a l'étude des caractéristiques physico-chimiques et analyses chromatographiques des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* Des. ssp *Eu-ciliatus* et *Coloratus*. Mémoire de D.E.S. Biochimie. Département de biologie, faculté des sciences. Université de Tlemcen.
- ✕ 10. **Bendjillali B., Tantaoui-El Araki A., Ismailialaoui M. et Ayadi A., 1986.** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes médicinales et phytothérapie. Pp : 748-752.
11. **Bendjillali B., Hammoumi M. et Richard H., 1987.** Polymorphismes chimiques des huiles essentielles de Thym du maroc. Caractérisation des composants. Sciences des aliments.7, 77-91.
12. **Benladgham R., Otmani Z., 2006.** Analyse phytochimique des huiles essentielles de deux plantes : *Thymus fontanesii* (Zaateur) et *Origanum vulgare* subsp *glandulosum* (Zaâter) de la région de Tlemcen. Mémoire de DES, Biochimie, département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.
13. **Benmoussat M., Chikh I., 1996.** Contribution à l'étude et analyse de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* Linne « Laurier noble » de la région de Tlemcen. Mémoire d'ingénieur d'état, CQA, département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.
14. **Bensaha D., Mekkaoui T. 2001.** Etude de l'influence de la température et de la lumière du jour sur la teneur en huiles essentielles de *Thymus algeriensis* et la mise en évidence du composé majoritaire par CCM et CPG. Mémoire de DES, Physiologie végétale, département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.
- 15. **Béraud J., 2004.** Le technicien d'analyses biologiques, guide théorique et pratique. Edition Tec et Doc, EMinter.
- 16. **Berthier J. et Valla G., 1998.** Moisissures- mycotoxines et aliments : du risque à la prévention. pp.16-28.
- ✕ 17. **Beylier- Maurel F., 1976.** Activités bactériostatiques des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana EPPOS*, p 58-283-286.
- 18. **Beylier-Maurel M.F., 1976.** Bacteriostatic activity of some australian essential oils. *Perfumer and flavorist*-4. Pp : 23-24.
- 19. **Bezanger – Beauquesue L., Pinkas M., Torck M., 1975.** Les plantes thérapeutiques modernes. Ed. Maloine.
- 20. **Biondi D., Cianci P., Geraci C., Ruberto G., 1993.** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour and fragrance Journal*, Vol. 8, 331- 337.
- ✕ 21. **Blanc-Mouchet J., 1987.** "Odeurs. L'essence d'un sens." *Autrement*. Paris.
- ✕ 22. **Bourrel C., 1993.** Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées. Thèse de l'Institut National Polytechnique de toulouse. Toulouse, France.

23. **Bourrel C., Dargent R., Vilrem G., Gaset A., 1995.** Analyse chimique et propriétés fongistatiques de quelques huiles essentielles en milieu liquide. Effet sur la morphogénèse hyphale. Rivista- Italiana. EPPOS SESTO Numero.
24. **Bourrel C., Dargent R., Vilrem G., Gaset A., 1995.** Etude des propriétés bactériostatiques et fongistatiques en milieu solide de 24 huiles essentielles préalablement analysées. Rivista- Italiana. EPPOS SESTO Numero.
25. **Brouillard R., 1993.** The Flavonoids, Advances in research since 1986, éd. J. B. Harborne, Chapman and Hall, London, 525-538.
26. **Bruneton J., 1987,** Pharmacognosie, Ecole technique de documentation, Ed. Ravoilie.
27. **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales, 3^e édition. Ed. Tec et doc. Paris.
28. **Burt S. A. et Reinders R. D., 2003.** "Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O157:H7" Letters in Applied Microbiology 36- 3: (162-167).
29. **Cahagnier B., 1988.** Qualité microbiologique des grains et teneur en ergostérol. Cahier des industries agro- alimentaires .pp 7-15.
30. **Carson C. F. et Riley T. V., 1995.** "Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of Malaleuca alternifolia" Journal of Applied Bacteriology 78- (264-269).
31. **Chaumont J.P. Leger D., 1989.** Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisin. Relation structure –activité. *Plant Med. Phyto.* 23(2), 124-126.
32. **Clarke H.T., Hayanes B., 1978.** Chimie organique : analyse qualitative et quantitative, Vuibert. Paris.
33. **Contin A., van der Heijden, R., Lefeber, A.W.M., Verpoorte, R., 1998.** The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate /pyruvate pathway in *Catharanthus roseu* cell culture. FEBS Letters. 434, 413-41.
34. **Cornillot P., Antoine P., Balansard G., Belaiche P., Fleurentin J., Girre L., Guillaume G., Mazars G., 1991.** Encyclopédie des médecines naturelles. Phytothérapie-Aromathérapie. Ed. Techniques. Paris- France.
35. **Cosentino S., Tuberoso C. I. G., et al., 1999.** "In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils" Lett Appl Microbiol 29- 2: (130-135).
36. **Courvalin P., Drugeon H., Flandroi J.P., Goldstein F., 1985.** Bactéricidie. Ed MALOINE. Paris.
37. **Courvallin P., Goldstein F., Philippon A., Sirot J., 1985.** L'antibiogramme. MPC, Videom, Paris.
38. **Craig W.J., 1999.** Health-promoting properties of common herbs. Am. J. Clin. Nutr., 70 (suppl): 491S- 499S.
39. **Crespo M.E., Jimenez J. et Navaro O.C., 1991.** Special methods for the essential oil of genus thymus. Modern methods of plant analysis.12, 41-61.
40. **Cruz Garcia T., Jimenez J., Navarro C., Cabo J., Cabo M.M., 1988.** Étude sur l'huile essentielle du *Thymus longiflorus* Boiss. Plantes Med. Phytother. TOME XXII (4), 22, 225-230.
41. **Cu J.Q., 1990.** Extraction de compositions odorants végétales par divers solvants organiques. Thèse de l'Institut Nationale Polytechnique. Toulouse, France.
42. **Cuvelier M.E., Richard H., Berset C., 1996.** Antioxydative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. J. Am. Oil Chem. Soc., 73, 645-652.
43. **Daoudi A., Djebbari F., 2003.** Etude analytique des modifications affectant l'huile essentielle de *Thymus ciliatus ssp coloratus* au cours de sa conservation. Influence de plusieurs paramètres sur le rendement. Application de CCM. Mémoire d'ingénieur d'état, CQA, département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.
44. **Dave Omah B., 2003.** L'isolation, la caractérisation et l'évaluation des métabolites secondaires dérivés de plantes pour utilisation dans le domaine de la santé humaine. Programme national de bio- produit et de bio- processus agriculture et agroalimentaire- Bulletin IBP, n° 1. Canada.

45. **Davis P., 2006.** Aromathérapie de A à Z. Le guide le plus complet jamais publié sur le sujet. Ed. VIGOT. ISBN : 978-7114-1814-5.
46. **De Billerbeck G., 2000.** "Activité fongique de l'huile essentielle de cymbopogon nardus sur l'aspergillus niger. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur." *Faculté des sciences pharmaceutiques*, Institut national polytechnique de Toulouse (236).
47. **Deans S. G. et Ritchie G., 1987.** "Antibacterial properties of plant essential oils" *International Journal of Food Microbiology* 5- (162-180).
48. **Djelmoudi K., Medjahedi K., 2001.** Contribution à l'évaluation comparative du pouvoir antifongique des huiles essentielles de six plantes aromatiques et médicinales de l'ouest algérien. Mémoire de D.E.S. Microbiologie. Département de biologie, faculté des sciences. Université de Tlemcen.
49. **Dob T., Dahmane D., Benabdelkader T., Chelghoum C., 2006.** Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii*. DOI: 10.1080/13880200600897106. *Pharmaceutical Biology*, Volume 44, Issue 8 October 2006, pages 607 – 612.
50. **Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A., Gmira N., 2003.** Screening phytochimique d'une endémique Ibéro- marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **142**,61-78.
51. **Dorman H. J. D. et Deans S. G., 2000.** "Antimicrobial agents from plants: antibacterial of plant volatile oils" *Journal of Applied Microbiology* 88- 2: (308-316).
52. **Encarta 2007.** Carte et situation géographique.
53. **Drouin G., 1997.** Résumé d'un article publié dans la revue Interface, novembre-décembre.
54. **Dupuis G., 2001.** Phénols & Quinones Cours de chimie générale et organique. Lycée Faidherbe de LILLE.
55. **Duraffourd C., Lapraz J.C., 1997.** Les règles d'utilisation des huiles essentielles en thérapeutique. Tunisie (Extrait).
56. **Edeoga H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O., 2005.** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of Biotechnology* Vol 4(7), pp 685-688. ISSN 1684 5315.
57. **Evans W.S., 1998.** Pharmacognosy, Ed: Beilière. Tandall (London).
58. **Faleiro M. L., Miguel M. G. et al., 2003.** "Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*" *Lett Appl Microbiol* 36- 1: (35-40).
59. **Farkas J., 1981.** Perioral dermatitis from marjoram, bay leaf and cinnamon. *Contact Dermatitis*; 7(2):121.
60. **Fauchère J.L. et Avril J.L., 2002.** "Bactériologie générale et médicale" Ellipses. Editions Paris, (365).
61. **Fesneau M., De Larochepequet P., 2005.** Les huiles essentielles de A-Z. La nature au service de la vie, les essences végétales naturelles.
62. **Fintelmann V., Weiss R.F., 2004.** Manuel pratique de Phytothérapie. Ed. VIGOT. ISBN : 2-7114-1641-0.
63. **Fouché J.G., Marquet A., Hambuckers A., 2000.** Les plantes médicinales, de la plante au médicament, Observatoire du Monde des Plantes Exposition du 19-09-2000.
64. **Franchomme P., Pénéol D. et al., 1990.** "Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique: matière, énergie, information". *L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges.* 2- (73-227).
65. **Franchomme P., Pénéol D. et al., 1990.** "Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle". *L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges.* 1- (1-69).
66. **Franchomme P., Pénéol D. et al., 1990.** "Matière médicale aromatique fondamentale". *L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges.* 4- (317-446).
67. **Ganou L., 1993.** Contribution a l'étude des mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielle. Thèse de l'INP Toulouse , France.

68. **Garnero J., 1991.** Les huiles essentielles, leurs obtentions, leur composition, leur analyse et leur normalisation. *Phytothérapie. Aromatotherapie*.2,9-20.
69. **Ghannadi A., Sajjadi S. E., Kabouche A., Kabouche Z., 2003.** *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. A Potential Source of Thymol-Rich Essential Oil in North Africa.
70. **Ghannadi A., Sajjadi S. E., Kabouche A., Kabouche Z., 2004.** *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. A Potential Source of Thymol-Rich Essential Oil in North Africa. 59C, p. 187-189.
71. **Gibault T., 2000.** Equation-Nutrition n°14 (APRIFEL) Endocrinologue – Nutritionniste.
72. **Gildmeister et Hoffmann, 1959.** *Die atherisc hen. Ole.* Berlin.
73. **Goncalo M., Goncalo S., 1991.** Allergic contact dermatitis from *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. *Contact Dermatitis*; 24(1) :40-4.
74. **Griffin S. G., Wyllie S. G. et al., 1999.** "The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity." *Flavour and Fragrance Journal* 14- (322-332).
75. **Grosjean N., 1993.** *L'aromathérapie. Santé et bien-être par les huiles essentielles.* Ed. Albin Michel. ISBN : 2-226-06406-0.
76. **Hammer K. A., Carson C. F. et al., 2003.** "Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil" *Journal of Applied Microbiology* 95- 4: (853- 860).
77. **Harborne J. B., 1967.** *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, Academic Press, New York, 1-30.
78. **Harborne J.B., 1998.** *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis.* Third edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).
79. **Helander I. M., Alakomi H. L. et al., 1998.** "Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram- bacteria" *Journal of Agriculture Food Chemistry* 46- (3590-3595).
80. **Hermal C., 1993.** "Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles." *Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier 1* (87).
81. **Hernandez Ochoa I. R., 2005.** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » d'origine végétale. Thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de toulouse. École doctorale : sciences de procédés spécialité : sciences des agro ressources.
82. **Heywood V.H., 1996.** *Les plantes à fleurs. 306 familles de la flore mondiale.* Ed. NATHAN. ISBN : 2.09.241056-3.
83. **Housni F., 1983-1984.** Contribution à l'étude de l'huile essentielle du « Laurier noble ». Section de technologie alimentaire. Institut agronomique et vétérinaire. HASSAN II, Rabat (Maroc).
84. **Inouye S., 2003.** "Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1)" *International Journal of Aromatherapy* 13- 2-3: (95-107).
85. **Janssen A.M., Chin N.L.J., Scheffer J.J.C., Svendsen B., 1986.** Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. *Statistics and correlations.* Vol. 8- *Pharmaceutisch Week blad scientific Edition.* pp. 289- 292.
86. **Janssen A.M., Scheffer J.J.C., Svendsen B., 1987.** Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 Literature Review. Aspects of the test methods. Vol. 53- *Planta Medica* Edition. pp. 395- 398.
87. **Jirasek L., Skach M., 1962.** Perioral contact eczema with eczematous stomatitis after the use of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) in food. [Czech] *Cesk Dermatol*; 37 :18-21.
88. **Joffin J.N., Leyral G., 2006.** *Microbiologie technique. Tome 1 : Dictionnaire des techniques*, 4eme édition. Scérén CRDP AQUITAINE.
89. **Kandil O., Radwan N.M., Hassan A.B., Amer A.M.M., El- Banna H.A., Amer W.M.M., 1994.** Extracts and fractions of *Thymus capitatus* exhibit antimicrobial activities. *Journal of Ethnopharmacology* 44(1994) 19- 24.
90. **Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogugbuaja V.O., 2004.** Identification of active principals of *M. Balsamina* (Balsma Apple) leaf extract. *J. Med. Sci*, 4(3): 179-182- Nigeria. ISSN 1682-4474.

91. Kunle O., Okogun J. et al., 2003. "Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract" *Phytomedicine* 10- (59-61).
92. Kuresh A.Y et Stanley G. D., 1999. Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris*), essential oil during the lifetime of the rat : its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mechanism of Ageing and development*. 109, 163-175.
93. Lahlou M., 2004. "Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils." *Phytotherapy Research* 18- (435-448).
94. Lambert R. J. W., Skandamis P. N. et al., 2001. "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol" *Journal of Applied Microbiology* 91- 3: (453-462).
95. Lamnaouer D., 2002. Conduite d'essais d'extraction et d'analyse des huiles essentielles et des principes actifs des plantes médicinales et aromatiques. Programme d'UICN en Afrique du Nord : Phase III (Composition chimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales du PNT).
96. Langenheim J.H., 1969. Amber: a botanical inquiry. *Science*. 163(872), 1157-1169.
97. Lanza I., 2002. La santé par les plantes, texte publié le 16/10 a la maison de la nature- Association Dplantum.
98. Laredj H., 2004. Les plantes médicinales, extraction des huiles essentielles et activités antibactériennes. Université de ANNABA, faculté de médecine.
99. Larivée L., 2002. Les huiles essentielles : un arsenal de guerre contre les microbes. Vol. 21, n° : 4. texte publié dans 4 temps.
100. Lee K.W., Everts H. et Beynen A.C., 2004. Essential Oils in Broiler Nutrition. Department of Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, the Netherlands. *International Journal of Poultry Science* 3 (12): 738-752 Ed. Asian Network for Scientific Information.
101. Lemiere C., Cartier A., Lehrer S.B., Malo J.L., 1996. Occupational asthma caused by aromatic herbs. *Allergy*; 51(9):647-9.
102. Ligia Salgeiro R., Roser V., Felix T., Xavier T., Salvador C., Joseph C., Antonio P.C. et Tomas A., 1997. Composition and infraspecific variability of Essential oils from *Thymus camphorates*. *Phytochemistry*.45, 1177-1183.
103. Lis-Balchin M., Deans S.G., Eaglesham E., 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. Vol. 13. 98- 104; Ed. John Wiley & Sons. Ltd.
104. Lis-Balchin M., Hart S. L. et al., 2000. "Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils, originating in Australia and New Zealand" *Phytotherapy Research* 14- (623-629).
105. Macchioni F., Perrucci S., Cioni P., Morelli I., et al, 2006. Composition and Acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* essential oils against *Psoroptes cuniculi*. *Journal of Essential Oils Research : JEOR*.
106. Mahmoudi Y., La thérapie par les plantes les plus communes en Algérie. Palais du livre. Blida. Imprimerie MOHLI.
107. Mailhebiau P., 1994. "La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs" Lausanne, (635).
108. Mann C. M., Cox S. D. et al., 2000. "The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)" *Lett Appl Microbiol* 30- 4: (294-297).
109. Martinez-Sosa M.A., 1981. Thèse de l'Institut National de Sciences Appliquées. Toulouse France.
110. Middleton E. et al., 2000. Pharmacological review, vol 52, N°4, 673-751.
111. Nahrstedt A., Butterweck V., 1997. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L.-*Pharmacopsychiat.*, 30 (suppl), p. 129-134.
112. Naves Y.R., 1974. Technologie et chimie des parfums naturels. Ed. Masson et Cie (Paris). pp 326.
113. Negre D., 1999. La guide du jardinier, Plantes aromatiques. Koeneman verlagsells. Allemagne.

114. Nguéfack J., Leth V., Amvam Zollo P.H., Mathur S.B., 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. Ed. Elsevier B.V. International Journal of Food, microbiology 94 (2004) 329- 334.
115. Nickelsen L., Jakobsen M., 1997. Qualitative risk analysis of aflatoxin toxicity for the consumers of Kenkey- a fermented maize production Food control 3, 149- 159.
116. Onawunmi G.O., Yisak W., Ogunlana E.O., 1984. J. Ethnopharmacol. 12, 279- 286.
117. Otsmani K., Kara A., 2002. Contribution à l'étude de l'huile essentielle du *Thymus ciliatus*. Comparaison avec l'action de thymol synthétique et quelques antibiotiques. Mémoire de D.E.S. Microbiologie. Département de biologie, faculté des sciences. Université de Tlemcen.
118. Özcan M., Chalchat J.C., 2004. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. BULG.J.Plant PHYSIOL, 30(3-4),68-73.
119. Ozden M.G., Oztas P., Oztas M.O., Onder M., 2001. Allergic contact dermatitis from *Laurus nobilis* (laurel) oil. Contact Dermatitis; 45(3) :178.
120. Packiyasothy E.V., Kyle S., 2002. Antimicrobial properties of some herbs essential oils. Food Australia 54(9) pp 384- 387.
121. Paris M., Hurabielle M., 1981. Abrégé de matière médicale- Parmacognosie. Tome 1, Généralités - Morphologies. P. 182 - 216. Ed. Masson, Paris. ISBN : 2-225-66165-0.
122. Paster N., Menasherov M., David U., Juven B., 1995. Antifungal activity of oregano and thym essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. Journal of Food Protection Vol. 58, N°1, Page 81- 85.
123. Pattnaik S., Subramanyam V. R. et al., 1996. "Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro" Microbios 86- (237-246).
124. Pattnaik, S., Subramanyam V. R., Bapaji M., Kole C.R., 1997. "Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils " Faculty Press (93- 45).
125. Pellecuer J., Roussel J.L., Andary C.,1980. Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles. *Rivista Italiana Essenzo (EPPOS)*. 23,45-50.
126. Pfohl-leszkowicz A., 1999. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Ed. Tec et Doc. Londres. Paris. New York.
127. Pibiri M.C. et Roulet C.A., 2003. "Study of the effect of essential oils on staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa." *Healthy Buildings 2003*, Singapore.
128. Pibiri M.C., 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse no 3311, présentée a la faculté environnement naturel, architectural et construit institut des infrastructures, des ressources et de l'environnement section d'architecture pour l'obtention du grade de docteur ès sciences. Ecole polytechnique fédérale de lausanne.
129. Piccaglia R., Marotti M., Giovanelli E., Deans S.G., Eaglesham E., 1993. Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial Crops and Products* 2(1993) 47- 50. Ed. Elsevier Science Publishers B.V.
130. Plate P., 1997. Plantes médicinales dans Asturies et la corniche cantabrique. Gijon : Ed. Trea, pp 166-7.
131. Quezel P. et Santa S., 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II.
132. Rasooli I., Razzaghi Abyaneh M., 2003. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Ed. Elsevier Ltd. Food control 15(2004) 479- 483.
133. Rayour et al., 2003. Mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components in *E. coli* and *Bacillus subtilis*, *The Journal of Essential oil Research*.
134. Richard H., 1989. Les arômes. Cahier de nutrition et de diététique XXIV, 2, p, 2-6.
135. Richard H., 1992. Epices et herbes aromatiques. Tec et doc. Lavoisier, Paris. E.N.S.I.A- Massy Cedex.

136. Richard H., Bendjilali B., Banquour N., Baritoux O., 1985. Etude de diverses huiles essentielles du thym du maroc. *Lebensm- wiss U. Technol.* Vol. 18, p. 105-110.
- X137. Robinson S.E et Alex J.F., 1989. Empoisonnement du bétail par les plantes. Agdex:130/643. Commande no:89-029.ISSN 1198-7138.
- X138. Rose A. E., 1965. *Technique of organique chemistry*, Vol. IV : Distillation. Ed. John Wiley & Sons. New York. 1-30.
139. Roulier G., 2005. Les huiles essentielles pour votre santé. Conseil en phyto-aromathérapie.
140. Salhi M., 1998. Contribution à l'étude qualitative et quantitative de l'huile essentielle du *Thymus ciliatus* de deux régions Sidi Djillali et Terny et leur pouvoir antimicrobien. Mémoire de DES, Biochimie, département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.
141. Sari H., 2003. Contribution à l'étude de la dégradation de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* « Laurier noble » de la région de Tlemcen en fonction de la température. Etude de son pouvoir antimicrobien. Mémoire d'ingénieur d'état, CQA, département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.
142. Simeon de Bouchberg M., Allergini J., Bessiere C., Attisso M., Passet J., Granger R., 1976. Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes de *Thymus vulgaris* Linnaeus. *Rivista Italiana Essenze- Profumi- piante officinali*.
143. Singh P., Pathak R.C., Sinha G.K., 1978. *Indian perfum.* 22, 76-78.
144. Sivropoulou A., Papanikolaou E. et al., 1996. "Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils" *Journal of Food Chemistry* 44- (1202-1205).
- X145. Smith-Palmer A., Stewart J. et al., 1998. "Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens" *Lett Appl Microbiol* 26- 2: (118-122).
146. Soliman K.M., badeaa R.I., 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Ed. Elsevier Science Ltd- Food and chemical Toxicology 40 (2002) 1669 - 1675.
147. Steinman H., 2005. Description de *Laurus nobilis*. J. Am. Diet. Assoc. harris@zingsolutions.com.
148. Suhr K.I., Nielsen P.V., 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of applied microbiology* 2003, 94, 665- 674.
- X149. Taiz L., Zeiger E., 1998. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, 2nd ed., Sunderland.
150. Tantaoui- Elaraki A., Errifi A., Benjilali B., Alaoui M ;, 1992. Antimicrobial activity of four chemically different essential oils. *Rivista- Italiana. EPPOS SESTO Numero*.
- X151. Tedder J.M., 1970. *Basic Organic chemistry*. Ed. John Wiley & Sons. New York.
152. Trease E., Evans W.C., 1989. *Pharmacognosie*. Billiare Tindall Can macmillian publishers. 11th edition.
- X153. Tsutomu F. et Hisashi K., 1971. « Phytochemistry ».8-10.
- X154. Valnet J., 2001. La phytothérapie- Traitement des maladies par les plantes- Se soigner par les plantes. Ed. VIGOT. ISBN : 2-253-03790-7.
- X155. Valnet J., 2005. L'aromathérapie. Ed. Maloine S.A. ISBN : 2-253-03564-5.
- X156. Vercauteren J., 2001. Plan, schémas, formule du cours de pharmacognosie. 3^{eme} et 4^{eme} Année. Université Victor Segalen Bordeaux 2. Laboratoire de pharmacognosie.
- X157. Veillot M., 2001. Etude sur les plantes, usages et statuts juridiques. *Le courrier de l'environnement* no 44, Ed. I.N.R.A.
- X158. Viaud H., 1993. Les huiles essentielles et leur distillation. Thérapeutiques naturelles- GNOMA.
159. Viollon C., Chaumont J.P., 1994. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 128(3), 151-153.
- X160. Vlietinck A.J., 2000. Productions végétales et valorisation pharmaceutique. Département de pharmaceutical sciences. University of antwerp (ua), belgium.

161. **Vourc'h G., 2001.** Interactions entre plantes longévives et grands mammifères : Défense chimiques du thuya géant et herbivorie par le cerf a-queue-noir en Colombie Britannique (Canada). Mémoire de doctorat en Biologie de l'évolution et écologie. Univ Montpellier.
162. **Walsh S. E., Maillard J.Y. et al., 2003.** "Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria" *Journal of Applied Microbiology* 94- 2: (240-247).
163. **Wichtl M., Anton R., 1999.** Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 3e Ed. Tec Doc. P.189-190.
164. **Wurtz ch-A., 1874.** Dictionnaire de chimie pure et appliquée. Paris, Hachette, t.I, p. 1269-1270.
165. **Zaika L. L., 1988.** "Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its Determination" *Journal of Food Safety* 9- 2: (97-118).
166. **Zimmermann E., 1998.** "Aromatherapie für Pflege-und Heilberufe: ein Kursbuch zur Aromapraxis" Stuttgart, (251).
167. **Hammer K.A. et al., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*,86, 985-990.
168. **Nguefack J., Budde B.B., Jakobsen M., 2001.** Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. Department of Biochemistry, University of Yaounde.
169. **Bouzouita N., Kachouri F., Hamdi M., Chaabouni M. M., 2003.** Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*. Volume 18, Issue 5., Pages 380-383. Ed. John Wiley & Sons, Ltd.
170. **Sayyah M., Saroukhani G., Peirovi A., Kamalinejad M., 2003.** Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. Volume 17, Issue 7, 2003. Pages 733-736. Ed. John Wiley & Sons, Ltd.
171. **Braga P.C., Dal Sasso M., Culici M., Galastri L., Marceca M.T., Guffanti E.E., 2006.** Antioxidant Potential of Thymol Determined by Chemiluminescence Inhibition in Human Neutrophils and Cell-Free Systems. Center of Respiratory Pharmacology, Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Milan, Milan, Italy.
172. **Giordani R., Regli P., Kaloustian J., Mikail C., Abou L., Portugal H., 2004.** Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. Laboratoire de Botanique, Cryptogamie et Biologie Cellulaire, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée.
173. **Simi A., Sokovi M. D., Risti M., Gruji-Jovanovi S., Vukojevi J., Marin P. D., 2004.** The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*. Volume 18, Issue 9., Pages 713-717. Ed. John Wiley & Sons, Ltd.
174. **Traboulsi A. F., El-Haj S., Tueni M., Taoubi K., Abi Nader N., Mrad A., 2005.** Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Science*. Volume 61, Issue 6, Pages 597-604. Ed. Society of Chemical Industry.
175. **AFNOR, 1992.** Recueil des normes françaises. Détermination des indices physicochimiques des huiles essentielles.
176. **Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S., Abrini J., 2006.** *Thymus* essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, substances naturelles et environnement*.
177. **Hadef Y., 2004.** Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. et de *Thymus numidicus* Poiret d'Algérie. Laboratoire de chimie analytique, département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Annaba.
178. **Hadef Y., Chefrour A., Kaloustian J., Mikail C., Abou L., Portugal H., Regli P., Giordani R., 2005.** Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de trois espèces de *Thymus spp* d'Algérie.

Annexes

Matériel et méthodes

Les tests phytochimiques (50) ; (56) ; (90) ; (152) :

I. Produit végétal épuisé avec l'éthanol :

Dans un ballon monocolé, surmonté d'un réfrigérant, mettre 50 g de matériel végétal en présence de 300 ml d'éthanol. Porter l'ensemble à reflux pendant 1h. Filtrer le mélange, ensuite soumettre l'extrait éthanolique aux tests suivants:

1. Alcaloïdes

Evaporer 20 ml de la solution éthanolique à sec. Ajouter 5 ml d'HCl 2N au résidu et chauffer dans un bain marie. Filtrer le mélange puis diviser le filtrat en deux parties égales. Traiter la première avec quelques gouttes du réactif de Mayer et la seconde avec le réactif de Wagner.

Observation : Présence de turbidité ou précipitation.

(+) Est enregistré si le réactif produit une légère opacité;

(++) Est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation;

(+++ Est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd.

* Réactif de Mayer :

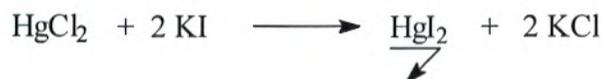
Dissoudre 1,358 g de HgCl₂ dans 60 ml d'eau. Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif une trouble plus un précipité blanc.

* Réactif de Wagner :

Dissoudre 2 g de KI et 1,27 g de I₂ dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

Mécanisme

1- Avec le réactif de **Mayer** : L'iodure de potassium forme avec l'ion Hg²⁺ un précipité rouge orangé HgI₂ selon la réaction suivante :



Le précipité se dissout dans un excès de solvant en donnant l'ion complexe [HgI₄]²⁻ très stable selon la réaction suivante :



2 - Avec le réactif de **Wagner** : L'iode est peu soluble dans l'eau, l'ajout du KI permet d'augmenter sa solubilité. Il se forme l'ion complexe I₃⁻ selon la réaction suivante:

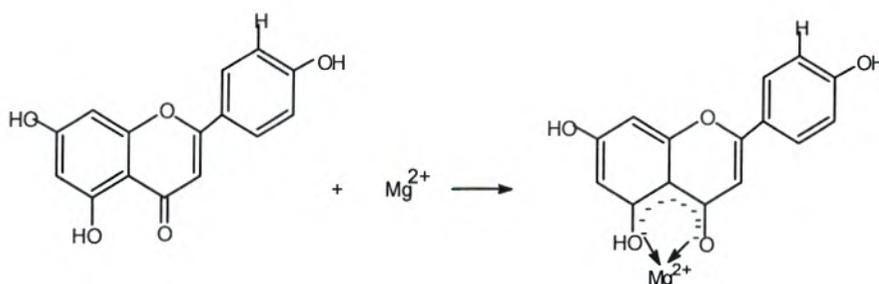


2. Flavonoïdes

Traiter 5 ml d'extrait alcoolique avec quelques gouttes d'HCl concentré et 0,5g de tournures de magnésium.

Caractérisation : Les flavonoïdes donnent généralement avec le magnésium en présence de l'acide chlorhydrique une coloration rose ou rouge après trois minutes.

Mécanisme



3. Tanins

A 1 ml de solution alcoolique, ajouter 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue - noire, verte ou bleue - verte et un précipité. Selon que les tanins sont cathéchiques, galliques ou éllagiques.

4. Composés réducteurs

Traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge - brique.

5. Ajouter à 25 ml de l'extrait étheré 15 ml de HCl 10%, porter à reflux pendant 30 mn. Refroidir la solution et extraire 3 fois avec 15 ml d'éther diéthylique. Traiter les deux phases séparément :

5. a / Anthracénosides

Traiter 8 ml de la solution extractive étherée par le réactif de Borntrager. Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangé - rouge au violet – pourpre.

5. b/ Anthocyanosides

Doser la solution aqueuse acide avec une solution de NaOH. S'il y a un virage de couleur en fonction du pH, la présence des anthocyanosides est confirmée.

- $\text{pH} < 3$ la solution prend une coloration rouge.
- $4 < \text{pH} < 6$ la solution prend une coloration bleue.

5. c/ Coumarines

Evaporer 5 ml de la solution extractive étherée. Dissoudre le résidu dans 1 à 2 ml d'eau chaude. Diviser le volume en deux parties. Prendre le demi volume comme témoin et ajouter à l'autre volume 0,5 ml de NH_4OH (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et les examiner sous la lumière U.V. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

8. Stérols et stéroïdes

Evaporer l'extrait alcoolique correspondant à 10 ml puis dissoudre le résidu obtenu dans 0.5 ml d'anhydride acétique et 0.5 ml de chloroforme.

Traiter le filtrat avec le réactif de Liebermann Burchardt. Si une solution bleue - verte apparaît, elle indique la présence des hétérosides.

*** Réaction de Liebermann Burchardt :**

Mélanger 5 ml de solution à tester avec 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser la solution reposée 30 mn à 21°C. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert. D'autre part, cette réaction donne avec les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques respectivement des colorations Verte -bleue et verte - violette.

II. Produit végétal épuisé avec de l'eau à chaud :

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, mettre 50 g de matériel végétal en présence de 300 ml d'eau. Porter l'ensemble à reflux pendant 1h. Filtrer le mélange et soumettre l'extrait aqueux aux tests suivants :

1. Amidon

Traiter 5 ml de la solution préparée avec le réactif d'amidon. L'apparition d'une coloration bleue violacée indique la présence d'amidon.

*** Réactif d'amidon :**

Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium. Chauffer pendant 5 mn. Diluer jusqu'à 500 ml. Chauffer 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain marie jusqu'à ébullition. Ajouter le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue - violacée.

2. Composés réducteurs

Ajouter à 2 ml de la solution aqueuse 5 à 8 gouttes de liqueur de Fehling, chauffer la solution. Un précipité rouge brique marque la présence des hydrates de carbonés.

3. Saponosides

Ajouter à 2 ml de la solution aqueuse un peu d'eau et ensuite agiter d'une manière forte. Une écume persistante confirme la présence des Saponosides. Abandonner le mélange pendant 20 mn et classer la teneur en Saponosides:

- Pas de mousse = Test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de 1-2 cm = test positif
- Mousse plus de 2 cm = test très positif

Indice de mousse :

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, mettre 2 g de matériel végétal sec et broyé en présence de 100 ml d'eau. Porter l'ensemble à reflux pendant 30mn. Après refroidissement et filtration, le volume est réajusté à 100ml. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1.3 cm de diamètre interne) avec 1,2,.....,10ml, le volume final étant réajusté à 10ml avec de l'eau distillée. Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 mn en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de 1 cm dans le x^e tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante :

$$I = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le } x^{\text{e}} \text{ tube} \times 5 / 0.0x.$$

4. Tanins

Traiter 1 ml de la solution aqueuse avec 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution diluée de FeCl₃. L'apparition d'une coloration vert foncée ou bleu- verte indique la présence des tanins.

5. Alcaloïdes

Mettre 15 ml de l'extrait aqueux dans un ballon bicol. Ajouter NH₄OH 10% jusqu'à pH = 9. Extraire avec 3x10 ml de chloroforme. Laver la solution chloroformique avec 3x2 ml d'HCl 10%. La solution aqueuse de lavage est divisée en trois parties égales. Tester les échantillons avec les réactifs de **Mayer** et de **Wagner**. Le troisième tube est considéré comme témoin.

III. Produit végétal épuisé avec l'éther diéthylique :

Dans un ballon, surmonté d'un réfrigérant à reflux, mettre 50 g en présence de 300 ml d'éther diéthylique. Porter l'ensemble à reflux pendant 1h. Filtrer le mélange et le soumettre aux différents tests suivants :

1. Huiles volatiles

Evaporer 20 ml de solution étherée. Le résidu ainsi obtenu est dissout dans l'éthanol. La solution éthanolique obtenue est ensuite concentrée à sec. Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu arôme.

Concernant le résidu gras, ce dernier est saponifié, à la fin de la réaction ajouter un peu d'eau et extraire la solution avec l'éther diéthylique.

2. Acides gras

Acidifier la solution aqueuse alcaline, puis l'extraire avec l'éther diéthylique. La solution étherée est ensuite concentrée à sec. Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras.

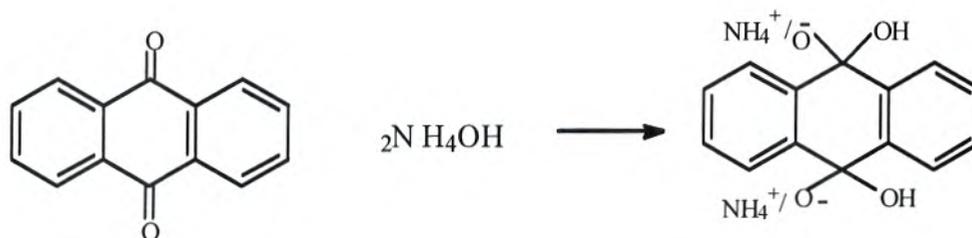
3. Alcaloïdes

Evaporer 10 ml de la solution étherique. Dissoudre le résidu obtenu dans 1,5 ml de HCl 2%. Ajouter à la solution aqueuse alcaline 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer. La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes bases.

4. Emodols

Evaporer 3 ml de l'extrait étherique. Dissoudre le résidu dans 1 ml de NH_4OH concentré. Ensuite traiter la solution avec la réaction de Bornträger (milieu alcalin aqueux). Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangé-rouge au violet pourpre.

Mécanisme



IV. Produit végétal épuisé avec l'éther de pétrole :

1. Quinones libres :

Un gramme de matériel végétal sec et broyé est placé dans un tube avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 h, les extraits sont filtrés et concentrés au rotavapor. La présence des quinones libre est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet.

Dans un ballon, surmonté d'un réfrigérant à reflux, mettre 5 g en présence de 30 ml d'éther de pétrole. Porter l'ensemble à reflux pendant 1h. Filtrer le mélange et le soumettre aux différents tests suivants :

2. Stérols et triterpènes :

Évaporer 10ml de l'extrait étherique. Dissoudre le résidu dans 0.5ml d'anhydride acétique et 0.5ml de chloroforme. Ajouter 2ml d'acide sulfurique concentré. Un anneau rouge brun ou violet dans la zone de contact avec le surnageant ou une coloration violette indique la présence des stérols et triterpènes.

3. les polyuronides :

10ml d'éthanol sont placés dans un tube à essai, 2 ml de l'extrait étherique sont ajoutés goutte à goutte. L'apparition d'un précipité violet ou bleu indique la présence d'un mucilage.

V. Produit végétal épuisé avec le chloroforme :

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, mettre 5 g de racine en présence de 30 ml de chloroforme. Porter l'ensemble à reflux pendant 1h. Filtrer le mélange et soumettre l'extrait chloroformique au test suivant :

1. Anthraquinones :

On ajoute du KOH aqueux 10%. Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge.

Les indices physicochimiques des huiles essentielles (175) :

I. Caractères physiques :

1-Densité relative à 20°C :

Définition : La densité relative d'une H.E est le rapport entre la masse d'un certain volume d'H.E à 20°C et la masse d'un égal volume d'eau distillée à 20°C.

Matériel utilisé :

- Pycnomètre en verre de capacité minimale 5 ml.
- Bain thermostatique, maintenu à la température de 20°C ± 0,2°C.
- Thermomètre de précision.
-

La densité relative, d_{20}^{20} est donnée par la formule suivante :

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m_0 : est la masse, en grammes, du pycnomètre vide.

m_1 : est la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d'eau.

m_2 : est la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d'H.E.

2-Déviations polarimétriques (pouvoir rotatoire) :

Définition : Le pouvoir rotatoire est un critère important de pureté de l'H.E, il permet d'indiquer si elle possède une activité optique dextrogyre (+) ou lévogyre (-).

Le pouvoir rotatoire d'une huile essentielle est l'angle exprimé en milliradian, et/ou degrés d'angle, dont tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde 589,3 ± 0,3 nm, celle-ci traverse une épaisseur de 100mm de l'H.E dans des conditions déterminées de température. Le symbole de cette grandeur est α_d^t .

Matériel utilisé :

- Polarimètre : SCHMIDT+ HAENSCH GmbH et Co (22486-2490)
- Lampe à halogène
- Tube d'observation: longueur de la cellule 100mm.

Expression des résultats : **Lois de BIOT (Linden, 1991).**

On calcule le pouvoir rotatoire par l'expression suivante :

$$\alpha_d^t = \alpha / L.C$$

α : valeur lue sur l'appareil en degré d'angle

L : épaisseur du film (cellule) en dm

C : concentration de l'essence (g/100ml).

3-miscibilité à l'éthanol : Une H.E est dite miscible à V volume et plus d'éthanol de titre alcoométrique déterminé à la température de 20°C, lorsque le mélange de 1 volume d'huile essentielle avec V volume de cet éthanol est limpide et le reste après addition graduelle d'éthanol de même titre, jusqu'à un total de 20 volumes.

4-Point de congélation :

Définition : Le point de congélation d'une huile essentielle est la température constante ou maximale observée pendant la phase de la libération de la chaleur latente de solidification lorsque cette H.E à l'état liquide est refroidie suivant la méthode décrite.

Mode opératoire : Les huiles essentielles sont placées dans des tubes à essai, à l'intérieur d'un congélateur, accompagnées d'un thermomètre.

5- Indice de réfraction:

Définition : c'est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

Matériel utilisé : la mesure de cet indice s'effectue à l'aide d'un réfractomètre classique, permettant la lecture directe d'indices de réfraction situés entre 1.3000 et 1.7000 avec une précision de ± 0.0002 . Le réfractomètre doit être ajusté, de manière à donner, à la température de 20°C les indices de réfractations suivantes : 1.3330 pour l'ED ; 1.4906 pour le p-cymène ; 1.5685 pour le benzoate de benzyle et 1.6585 pour le bromo-1- naphthalène.

Expression des résultats : L'indice de réfraction n_D^t à la température de référence t est donné par la formule :

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0.0004 (t' - t)$$

n_D^t : La valeur de la lecture obtenue à la température t' , à laquelle a été effectuée la détermination.

II. Caractères chimiques :

1-Indices d'acide (IA) :

Définition : L'indice d'acide exprime le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libres contenus dans un gramme d'HE.

Mode opératoire :

- On pèse 2g de l'HE, et on l'introduit dans un ballon en verre.
- On ajoute 5 ml d'éthanol à 95% et 5 gouttes de phénophtaléine (PP) à 0,2%
- On neutralise en ajoutant grâce à une burette la solution éthanolique de KOH (0,1 mole/l) jusqu'à obtention d'une couleur rose.
- On note le volume de la solution éthanolique de KOH ajoutée.

Le calcul de l'IA est donné par la formule :

$$IA = 5,61 \times V/m$$

5,61 : Correspond à 0,1 mole/l de KOH

V : Volume en ml de la solution éthanolique de KOH (0,1 mole/l) utilisée pour le titrage.

m : masse en g de l'HE.

2-Indice d'ester (IE) :

Définition : L'indice d'ester est le nombre de milligramme de KOH nécessaire pour neutraliser les acides libres par l'hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'HE.

Mode opératoire :

- On pèse 2g de l'HE, et on l'introduit dans un ballon en verre.
- On ajoute grâce à une burette 25ml de la solution éthanolique de KOH (0,5 mole/l).
- On adapte le réfrigérant et on place le ballon sur le chauffe ballon et on laisse chauffer pendant une heure.
- On laisse refroidir puis on ajoute 20ml d'eau distillée et 5 gouttes de PP à 0,2%.
- Enfin, on titre l'excès de KOH avec la solution d'acide chlorhydrique à 0,5 mole/l.
- Parallèlement à l'opération citée, on effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions et avec les mêmes réactifs.

Le calcul de l'IE est donné par la formule :

$$IE = (28,05 \times (V_0 - V_1) / m) - IA$$

28,05 g/l : correspondant à **0,5 mole/l** de KOH.

m : masse en gramme de la prise d'essai.

V₀ : Volume en ml de la solution cl (0,5 mole/l) utilisée pour l'essai à blanc.

V₁ : Volume en ml de la solution cl (0,5 mole/l) utilisée pour la détermination de l'IE de l'HE.

3-Indice de peroxyde (IP) :

Définition : L'indice de peroxyde est le nombre de microgrammes actifs du peroxyde contenu dans un gramme de produits et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode dans les conditions de la méthode décrite.

Mode opératoire :

- Peser 1g de l'HE dans un micro tube qu'on met dans un Erlenmeyer, ajouter 10 ml de chloroforme et agiter.
- Ajouter 15 ml d'acide acétique CH₃COOH, puis 1 ml de la solution aqueuse saturée de KI, boucher aussitôt, agiter et abandonner le flacon pendant 5 min à l'abri de la lumière. Ajouter 75 ml d'eau distillée.
- Titrer soigneusement en présence d'empois d'amidon, l'iode libéré avec la solution Na₂S₂O₃ (0,01N) jusqu'à décoloration totale de la solution.

Le calcul de l'IP est donné par la formule :

$$IP = 8000 V / m$$

m : est la masse de la prise d'essais.

V : est le volume de la solution de thiosulfate N/100.

4-Indice d'iode (II) :

Définition : L'indice d'iode est une mesure de l'insaturation des constituants de l'huile essentielle. C'est la masse d'iode qu'on peut fixer dans les doubles liaisons.

Mode opératoire :

- Peser 1g de l'HE dans un micro tube qu'on met dans un Erlenmeyer, ajouter 10 ml de chloroforme et 25 ml de solution de HANÜCH. Boucher et agiter.
- Placer la solution à l'obscurité pendant 1 heure.

- Ajouter 20 ml de la solution aqueuse saturée de KI à 10% fraîche et 150 ml d'eau distillée, agiter pour extraire l'iode I₂ contenu dans le CH₂O.
- Titrer soigneusement avec la solution Na₂S₂O₃ (0,1N) jusqu'au virage de couleur brune initiale au jaune. A ce moment, ajouter 2 gouttes d'amidon frais et la couleur devient bleu violette.
- Continuer à titrer avec la solution Na₂S₂O₃ (0,1N) jusqu'à décoloration.
- Pour le témoin, nous suivrons les mêmes étapes en utilisant 1g d'ED.
- Le calcul de l'IP est donné par la formule :

$$II = [A - B/m] \cdot f \cdot 12.69$$

m : est la masse de la prise d'essais.

A : est le volume de la solution de thiosulfate N/10 du témoin.

B : est le volume de la solution de thiosulfate N/10 de l'échantillon.

f : facteur de Na₂S₂O₃ ; f ∈ [0.99-1.05]

Préparation des solutions :

KOH alcoolique 0,1M : 0,56g de KOH +3,5 ml d'ED. Compléter par 100ml d'éthanol.

KOH alcoolique 0,5M : 2,8g de KOH +3,5 ml d'ED. Compléter par 100ml d'éthanol.

HCl 0,5N : 4,08ml d'HCl dans 100ml d'ED.

Na₂S₂O₃ 0,01 N : 0,31g de Na₂S₂O₃ dans 100ml d'ED.

KI Saturé : KI + ED

Solution d'amidon : Chauffer 25ml d'ED, puis ajouter 0,75g d'amidon.

Phénophtaléine à 0.2% : 0,2g de PP dans 100 ml d'éthanol.

HANÜCH : 12.7g de I₂ + 100ml de CH₃COOH + 2.6ml de Br₂ (à l'aide d'une burette). Compléter le mélange avec du CH₃COOH jusqu'à 1L.

KI (indice d'iode) : 10g de KI + 100ml d'ED.

Solution d'amidon (indice d'iode) : 20 à 30 mg d'amidon + 10ml d'ED. Chauffer jusqu'à ébullition, le mélange devient transparent. Refroidir.

Na₂S₂O₃ 0,1 N : 25g de Na₂S₂O₃ 1N, 5 H₂O +250 ml d'ED, agiter. Compléter jusqu'à 1 L avec l'ED. Laisser la solution pendant une semaine pour se stabiliser.

Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles :

I. Tests de vérification de la pureté des souches (15) ; (88) :

1-Examen à l'état frais :

Intérêt : la mise en évidence de la présence des bactéries, leur forme, leur mode de groupement, leur densité et leur mobilité.

Technique :

- Déposer à l'aide d'une pipette pasteur ou d'une anse sur une lame propre, une goutte de prélèvement de culture en milieu liquide ou d'une suspension réalisée dans de l'eau distillée à partir de colonies ayant poussé sur un milieu solide ;
- Recouvrir la préparation d'une lamelle qui peut être lutée avec de la paraffine ou la vaseline pour éviter la déshydratation et les mouvements de convection liquidiens ;
- Observer rapidement au grossissement 40 et en faible luminosité.

2- Coloration de Gram :

Principe : elle est basée sur la différence de perméabilité des bactéries à l'alcool qui est liée à une différence de structure pariétale des deux grands groupes Gram+ et Gram-.

Technique :

- Réaliser le frottis et le fixer ;
- Colorer au violet de gentiane durant environ 1mn ;
- Laver à l'eau ;
- recouvrir de lugol. Laisser agir environ 30secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Faire couler l'éthanol sur la lame jusqu'à décoloration ;
- Laver à l'eau. Egoutter. Sécher sur papier filtre ;
- Colorer à la fuchsine ou à la safranine pendant 1mn ;
- Laver à l'eau. Egoutter. Sécher sur papier filtre ;
- Observer au microscope à immersion à l'objectif x 100.

Les bactéries Gram+ apparaissent en bleu foncé ou violet, les Gram- en rose ou rouge.

3- Tests enzymatiques :

Catalase :

Déposer une goutte de H₂O₂ à 10V sur une lame et y dissocier une colonie prélevée sur un milieu solide avec une pipette boutonnée ;

La mise en évidence se traduit par la production de bulles gazeuses d'O₂ à partir de H₂O₂. Le dégagement de gaz est immédiat.

Oxydase :

- Mettre dans un tube 1ml d'eau physiologique et y dissocier une quantité suffisante de culture prélevée à partir de milieu solide (culture de 18-24h) ;
- Ajouter un disque OX imprégné du réactif dans le tube à l'aide d'un instrument n'oxydant pas le réactif ;
- La lecture doit être immédiate.

La réaction est positive s'il y a apparition d'une coloration rose à violette.

II. Aromatogramme (méthode de Vincent) :

Description (88) : Le milieu de culture gélosé en surfusion est coulé dans des boîtes de Pétri.

➤ *Inoculum*

L'inoculum doit être de 10⁶ bactéries/ml afin d'obtenir des colonies justes confluentes.

Diluer l'inoculum de manière suivante: 10 µl par ml d'eau physiologique (NaCl 9 g/litre).

Tapis bactérien

Inonder les boîtes avec 1 ml de l'inoculum.

➤ *Application des disques*

Déposer délicatement les disques de papier filtre préalablement imprégnés d'huile essentielle à la surface du milieu gélosé.

➤ *Incubation*

Incubation à 37°C entre 18 et 24 heures.

➤ *Résultats*

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à de la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré et exprimé soit en cm, soit en mm.

III. Méthode de contact direct (17) ; (37) : méthode modifiée par Bendjillali et al., 1986.

Un volume de 2.5 ml de Tween 80 est étendu à 90ml avec l'eau distillée et stérilisée à 120°C/15mn. A 9 ml de cette solution, on ajoute aseptiquement 1ml d'huile essentielle de façon à ce que le rapport huile essentielle/ Tween 80 soit de 80/20, car il a été démontré par **Allergini et al., 1973** que ce rapport donnait des émulsions assez stable.

On obtient ainsi la solution mère « SM », à partir de laquelle, on procédera à des dilutions successives pour obtenir les différentes concentrations voulues.

Dans des tubes à essais contenant chacun 13.5ml de milieu de culture gélosé en état de fusion, on ajoute aseptiquement 1.5ml de la solution « SM » ou des diverses dilutions de cette solution.

Dans le tube témoin, on ajoute 1.5ml de la solution Tween80 dans l'eau distillée.

On agite les tubes, on coule dans les boîtes de pétri, et on laisse refroidir.

➤ *Ensemencement*

Les microorganismes sont ensemencés en spot.

➤ *Incubation*

Incubation à 37°C entre 18 et 24 heures.

➤ *Résultats*

A la sortie de l'étuve, la lecture se traduit par la présence ou l'absence de la croissance bactérienne. Noter l'aspect des colonies bactériennes : Identique au témoin : +++, Stérile : -, Non identique au témoin : ++, +, ±.

IV. Composition des milieux de culture (g/l):*Bouillon nutritif BN:*

5g extrait de viande

10g peptone

5g NaCl

Gélose nutritive GN:

BN + 10g agar

Cœur cervelle BHIB :

10g protéose- peptone

12.5g infusion de cervelle de veau

5g infusion de cœur de bœuf

2g glucose

5g NaCl

2.5g Na₂HPO₄

Mueller- Hinton:

300cm³ infusion de viande de boeuf

17.5g peptone de caséine

1.5g amidon de maïs

17g agar

Sabouraud :

10g peptone

20g glucose massé

15g agar

Potato Dextrose Agar PDA:

200g pomme de terre

30g agar

20g sucrose

PDA acidifié :

On ajoute 1ml d'acide lactique à 25% dans 250ml de milieu PDA juste avant l'utilisation.

Mode d'emploi

Les huiles essentielles ont des propriétés communes et des propriétés spécifiques qui se conjuguent dans leur action thérapeutique. Suivant leur composition, elles peuvent être plus ou moins indiquées en usage interne ou en usage externe, que ce soit par application cutanée ou en inhalation **(1)**.

- usage externe :

L'aromathérapie externe utilise les massages, les bains et les frictions et enveloppe les soins de la peau (masques, compresses, crèmes, lotions) ou des cheveux.

Pour les massages, les huiles essentielles sont diluées dans une huile de base végétale : huile de noisette, huile d'amande douce, huile d'avocat etc. ... Ces huiles de base doivent être des huiles vierges, première pression à froid. Cette action par l'application cutanée est due à leur extraordinaire pouvoir de pénétration à travers la peau **(1)**.

Les compresses ou masques d'argile sont excellents pour les soins de la peau et aussi pour les contusions ou les foulures **(158)**.

- usage interne:

Il est délicat ; le dosage des huiles essentielles doit être précis et il y a des contre-indications. C'est la méthode choisie lorsque l'on veut agir sur la digestion, l'intestin, le foie, les voies biliaires ou l'élimination.

D'une manière générale, les huiles essentielles ne doivent pas être absorbées pures mais diluées à raison de 5 à 15 % **(1)**.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة نوعين من النباتات الطبية و العطرية الجذ معروفة في مجتمعنا و هما *Laurus nobilis* (رند) و *Thymus fontanesii* (زعر). مكنتنا الاختبارات الفيتو كيميائية التي تم إنجازها خلال هذه الدراسة من إظهار مختلف المكونات الكيميائية الموجودة بأوراق كلتا النباتين. قمنا باستخلاص الزيوت الأساسية لهاتين النباتين بطريقة التقطير ببخار الماء. المردودات المتحصل عليها كانت مهمة إذ يمكن لهذه الزيوت أن تستغل صناعيا. قمنا أيضا بتحديد بعض الخصائص الفيزيوكيميائية لهذه الزيوت و ذلك مباشرة بعد استخلاصها. إن دراسة فساد هذه الزيوت بمرور الوقت أظهرت عدم ثباتها كيميائيا عندما تخزن معرضة للضوء و في درجة حرارة الجو. و على عكس ذلك فإن التخزين يكون جيدا في درجة حرارة منخفضة و بعيدا عن الضوء. أظهرت دراسة نشاط هذه الزيوت ضد بعض البكتيريا و الفطريات أن لزيت *Thymus fontanesii* قدرة فعالة ضد هذه الميكروبات مقارنة بزيت *Laurus nobilis*. تم تتبع هذا النشاط بدلالة ظروف تخزين هذه الزيوت.

الكلمات المفتاحية: *Laurus nobilis*, *Thymus fontanesii*, زيت أساسي, الاختبارات الفيتو كيميائية, الخصائص الفيزيوكيميائية, نشاط ضد البكتيريا.

Résumé

Notre travail a pour but d'étudier deux plantes médicinales et aromatiques très connues par la population locale appelées *Laurus nobilis* L (Laurier) et *Thymus fontanesii* (Thym). Des tests phytochimiques réalisés lors de cette étude sur ces plantes ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existantes dans les feuilles de chacune. L'extraction des huiles essentielles des deux plantes a été effectuée par un entraînement à la vapeur d'eau. Les rendements obtenus sont intéressants même sur le plan d'une exploitation industrielle. Un certain nombre de caractères physicochimiques a été déterminé sur les huiles fraîchement extraites. L'étude de la dégradation de ces huiles en fonction du temps a montré une forte instabilité lorsqu'elles sont conservées à température ambiante et en présence de la lumière et au contraire une bonne conservation au faible température et à l'abri de la lumière. L'étude de l'activité de ces huiles essentielles sur des souches bactériennes et fongiques montre que le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle du thym est plus important comparé à celui de l'huile essentielle du laurier. Cette activité a été suivie en fonction de la conservation de ces huiles essentielles.

Mots clef: *Thymus fontanesii*, *Laurus nobilis*, phytochimie, Huiles essentielles, caractères physicochimiques, pouvoir antimicrobien.

Summary

Our work aims at studying tow medicinal and aromatic plants very well by the local population. They are called *Laurus nobilis* L (Laurel) and *Thymus fontanesii* (Thyme). The phytochemical tests, which had been done while studying these plants permitted to us to detect different families of the chemical compounds existing in both of these plant's leaves. The extraction of the essential oils from both of them was effectuated by a steam distillation. The obtained yields are very interesting even on an industrial exploitation level. A certain number of physicochemical characters were determined on the oils, freshly extracted. The study of degrading of these oils by time function has shown a great instability while they are conserved under an ambient temperature and exposed to light, and a good conservation can be realized if they are kept under a low temperature and out of light. The study of these essential oils activity on some bacteriological and fungous stubs shows that the antimicrobial capacity of the thyme's essential oils is much more important compared to the one of the laurel. This activity has been followed in function of conserving essential oils.

Key words: *Thymus fontanesii*, *Laurus nobilis*, phytochemical tests, essential oils, physicochemical characters, antimicrobial activity.