

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et la Vie
Département de Biologie des Populations et Organismes

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du Diplôme de
Master en Science de la Nature et de la Vie
Option : Phytothérapie et Santé

THEME

**Apport thérapeutique de l'essence aromatique du
thym (*Thymus vulgaris* L.) dans la lutte-prévention
des pathologies fongique et inflammatoire**

Présenté par
Bahlouli Sihem

Date de Soutenance
Mardi 15/09/2015 à 12h00

Devant le jury composé de :

M ^{me} Makhlouf	MAA	Université Blida 1	Présidente
M ^{me} Metidji H.	MAA	Université Blida 1	Examinatrice
M. Boukhatem M.N	MC-B	Université Blida 1	Promoteur
Mme Kellou D.	Professeur	Service Mycologie, IPA Alger	co-Promotrice

🌀 Promotion: 2014-2015 🌀

Dédicaces

Je dédie ce mémoire:

A mes chers parents qui m'ont apporté de l'aide et m'ont toujours poussé vers l'avant. Pour tous leurs sacrifices, leur inquiétude, je leur serai toujours reconnaissante.

A mes chères sœurs, Aziza, Sarah, Khadidja, Zineb.

A mes beaux frères, Yacine, Housseem ELddine.

Et à tous les membres de Ma famille.

Remerciements

Je remercie avant tout ALLAH- le tout puissant- de m'avoir guidé durant toute ma formation.

Merci à mes proches notamment mes parents, mon grand-père, mes sœurs Aziza, Sarah, Khadidja, Zineb, merci pour votre soutien moral et votre amour...

Je remercie Madame Makhlouf de nous avoir honoré de présider notre jury de soutenance.

Je remercie Madame Mitidji., qui a bien voulu examiner ce manuscrit et pour sa présence parmi les jurys.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mr Boukhatem, enseignant à la faculté de science de nature et de la vie, Université de Blida 1 pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail.

Je tiens à remercier Mme Kellou Dhahbia, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire au niveau du service Mycologie IPA pour effectuer une bonne partie de ce travail. Je la remercie vivement pour sa collaboration. Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de Mycologie, pour leur convivialité pour leurs disponibilités.

Je tiens à remercier Mr chadère ainsi que l'ensemble du personnel du Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques, pour leur convivialité, et disponibilité.

Je tiens à remercier Docteur Benali Yasmine ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques Vétérinaires, pour leur convivialité, et disponibilité.

Je tiens particulièrement à exprimer ma gratitude au Docteur Ammé Nassima, Chafaa Imen, et les remercier pour m'avoir aidé énormément.

Je tiens à remercier Mme Amina, Dr Bouaoni, Mme Fahina, Mme Warda, Kahina, Donia, Kanza, Louisa, Laila, Akram, Salima, Asma, Hassiba, Imen, Ryma, Rabeh, Ami Moussa.

Mes remerciements iront également à mes très chères amis, Baya, Amina, Ikram, Amel, Foued.

TABLE DES MATIERES

Résumé

Abstract

Liste de Tableaux

Liste de Figures

Liste des Abréviations

Introduction 1

Chapitre 1 : Monographie de la Plante Etudiée : *Thymus vulgaris*

1.1. Condensé historique	3
1.2. Description botanique	3
1.3. Place dans la systématique	6
1.4. Dénominations internationales	6
1.5. Étymologie	6
1.6. Habitat et répartition géographique	7
1.7. Culture et période de récolte	8
1.8. Composition et Principes actifs	8
1.9. Bienfaits et vertus thérapeutiques de la plante	8
1.10. Précautions d'emploi et effets secondaires	10
1.11. Huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	10

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

2.1. Matériel végétal et huile essentielle	13
2.2. Matériel animal	13
2.3. Milieux de cultures et agents chimiques	14
2.4. Souches microbiennes	14
2.5. Étude analytique de l'huile essentielle	14
2.5.1. Propriétés organoleptiques	14
2.5.2. Analyses chromatographiques de l'huile essentielle	14

2.6. Evaluation de l'activité antifongique <i>in vitro</i>	15
2.6.1. Technique de l'aromatogramme (diffusion en milieu solide)	15
2.6.2. Technique de microatmosphère (diffusion en phase vapeur)	16
2.6.3. Détermination des CMI par macrodilution en milieu gélosé	17
2.7. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique <i>in vivo</i>	18

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

3.1. Etude analytique de l'huile essentielle	22
3.1.1. Caractéristiques organoleptiques	22
3.1.2. Détermination du profil chromatographique	22
3.2. Résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle <i>in vitro</i>	26
3.2.1. Résultats de l'aromatogramme	27
3.2.2. Résultats de la microatmosphère	30
3.2.3. Etude comparative : Aromatogramme versus Microatmosphère	33
3.2.4. Détermination des Concentration Minimales Inhibitrices	34
3.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique <i>in vivo</i>	36
3.4. Etude anatomopathologique	37

Conclusion	43
-------------------	----

Références Bibliographiques	45
------------------------------------	----

Annexes	
----------------	--

LISTE DES TABLEAUX

Titre	Page
Tableau 1.1. Classification botanique du <i>Thymus vulgaris</i> .	5
Tableau 2.1 : Souches fongiques utilisées dans le screening antimicrobien.	13
Tableau 3.1. Propriétés organoleptiques de l'essence aromatique du thym commun.	19
Tableau 3.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> distillée, à échelle industrielle, par entraînement à la vapeur d'eau sous pression.	20
Tableau 3.3. Principaux composés décelés dans l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i> provenant de différents écosystèmes.	22
Tableau 3.4. Activité antifongique <i>in vitro</i> de l'essence aromatique de <i>Thymus vulgaris</i> .	23
Tableau 3.5. Concentrations Minimales Inhibitrices des champignons unicellulaires déterminées par dilution en milieu gélosé.	31
Tableau 3.6. Etude comparative entre les Concentrations Minimales Inhibitrices des levures soumis au pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> .	32
Tableau 3.7. Réduction de l'inflammation topique induite dans les oreilles des souris.	33

LISTE DES FIGURES

Titre	Page
Figure 1.1. Illustration de l'aspect morphologique du thym commun (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	4
Figure 1.2. Répartition du Thym dans le monde.	6
Figure 1.3. Exemple de chromatogrammes montrant trois chémotypes différents de l'essence du thym commun.	9
Figure 2.1. Illustration de la méthode de l'aromatogramme.	16
Figure 2.2. Illustration de la méthode de Microatmosphère.	18
Figure 3.1. Structure chimique de quelques composés détectés dans l'essence aromatique de <i>Thymus vulgaris</i>	20
Figure 3.2. Chromatogramme de l'essence du <i>T. vulgaris</i> distillée par entraînement.	21
Figure 3.3. Aromatogramme de l'essence du thym sur certaines souches fongiques.	25
Figure 3.4. Pouvoir antifongique de la phase vapeur de l'essence aromatique du thym commun (<i>Thymus vulgaris</i>) sur certaines souches fongiques.	28
Figure 3.5. Etude comparative : Aromatogramme vs Microatmosphère	31
Figure 3.6. Coupes histopathologiques au niveau des oreilles de souris de différents lots.	36

LISTE DES ABREVIATIONS

-
- | | |
|---|---|
| – AFNOR : Association Française de Normalisation | – ® : Marque enregistrée |
| – AINS : Anti-inflammatoire Non Stéroïdien | – AIS : Anti-inflammatoire Stéroïdien |
| – ATB : Antibiotique | – ANOVA : Analyse des Variances |
| – ATCC : American Type Culture Collection | – DPO : Différence de Poids des Oreilles |
| – ATF : Antifongique | – Gx : Grossissement |
| – ATP : Adénosine Tri Phosphate | – HEX: Hexomedine |
| – CG-SM : Chromatographie Gazeuse-Spectromètre de Masse | – Ig : Immunoglobulines |
| – CMI : Concentration Minimale Inhibitrice | – IPA : Institut Pasteur d'Alger |
| – CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse | – IR : Indice de Rétention |
| – DMSO : Diméthylsulfoxyde | – NF : Norme Française |
| – DZI : Diamètre de Zone d'Inhibition | – OMS : Organisation Mondiale de la Santé |
| – EVE : Entraînement à la Vapeur d'Eau | – ONAB : Office National du Bétail |
| – FID : Flamme Ionisation Detector | – PAM : Plantes Aromatique et Médicinale |
| – GABA : Acide γ -AminoButyrique | – PNN : Polynucléaires Neutrophiles |
| – HE : Huile Essentielle | – T- : Témoin négatif |
| – ISO : Organisation Internationale de Normalisation | – T+ : Témoin positif |
| – NMRI : Naval Medical Research Institute | – v/v : volume/volume |
| – SAB : Sabouraud additionné de Chloramphénicol | |
-

RESUME

L'objectif assigné à ce travail consiste à valoriser l'essence aromatique d'une plante à parfum, *Thymus vulgaris* L., en aromathérapie anti-infectieuse et/ou comme ingrédient actif dans la prévention des pathologies inflammatoires topiques.

La composition chimique de l'huile essentielle (HE), déterminée par Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse, a révélé la présence de 13 constituants. Le composé majoritaire est le carvacrol avec un taux de 83.8%, suivi par le *p*-cymène (8.15%) et γ -terpinène (4.96%).

Le screening antifongique de l'HE a été accompli par plusieurs méthodes sur différentes souches mycéliennes (9 levures et 7 moisissures). En phase liquide, l'HE a exhibé une activité inhibitrice remarquable sur la croissance de toutes les souches étudiées avec des Diamètres des Zones d'Inhibition variant entre 53 et 85 mm. Cette huile est douée aussi d'un pouvoir fongicide à forte dose car toutes les souches ont été inhibées. En phase vapeur, de meilleurs résultats ont été obtenus notamment pour *Candida tropicalis* où une inhibition totale a été notée à la plus faible concentration. De plus, cette action inhibitrice est « dose-dépendante ». Une méthode quantitative, dilution en milieu gélosé, a été explorée afin de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI). Toutes les souches levuriformes ont des CMI faibles, de l'ordre de 0.3 μ L/mL, excepté *Rhodotorula* sp. (0.15 μ L/mL)

Sur le plan thérapeutique, le potentiel anti-inflammatoire topique de l'HE a été exploré *in vivo*. Par la méthode de l'œdème à la l'huile de croton, le calcul du pourcentage de réduction de l'œdème a révélé que les lots traités avec l'HE, à différentes doses (2.5, 0.25 et 0.05 mg/mL), ont présenté un taux élevé (65%-73%), statistiquement identique ($p>0.05$) à celui du contrôle positif. Cette activité a été aussi confirmée, à l'échelle cellulaire, par une étude anatomo-pathologique.

En somme, les résultats obtenus laissent entrevoir des perspectives d'application pharmaceutiques de l'essence du thym commun dans la prévention-traitement des infections fongiques et des pathologies inflammatoires locales.

Mots-clés: Antifongique naturel ; Anti-inflammatoire topique ; Carvacrol ; Huile essentielle ; *Thymus vulgaris*.

ABSTRACT

The aim of this study was to enhance the essential oil of an aromatic and medicinal plant, *Thymus vulgaris*, as antimicrobial agent in aromatherapy and/or as an active ingredient in the prevention or management of topical inflammatory diseases.

The chemical composition of *Thymus vulgaris* essential oil (TVEO) was determined by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and revealed the presence of 13 compounds. Carvacrol was found to be the major component (83.8%), followed by *p*-cymene (8.15%) and γ -terpinene (4.96%).

Antifungal screening of TVEO was assessed by several methods against various fungal strains (9 yeasts and 7 molds). In the liquid phase, TVEO exhibited a potent inhibitory effect against all the fungal strains with Diameter of Inhibitory Zones (DIZ) varying between 53 to 85 mm. With the highest dose, TVEO was illustrated by a fungicidal power against all mycelial strains. In the vapor phase, better results were obtained in particular with the strains of *Candida tropicalis* where complete inhibition was observed at the highest concentration. Else, this inhibitory effect of TVEO was "dose-dependent." The Minimum Inhibitory Concentrations of yeast were determined by agar dilution method and revealed that MIC varied from 0.3 to 0.15 μ L/mL for yeast strains.

Topical anti-inflammatory potential of TVEO was also explored *in vivo* by the test of croton oil-induced ear edema. TVEO exhibited a potent anti-inflammatory effect at all doses (2.5, 0.25 and 0.05 mg/mL) which were statistically similar to the positive control. This activity was also confirmed at the cellular level by a histopathology analysis.

Finally, our results suggest the potential application of TVEO in the prevention-management of fungal infections and topical inflammatory illnesses.

Keywords: Natural Antifungal; Topical Anti-Inflammatory; Carvacrol; Essential Oil; *Thymus vulgaris*.

الهدف المحدد لهذا العمل هو تقييم النشاط البكتيري، و الوقاية من الأمراض الالتهابية الموضعية للزيت العطري المستخرج من النبات العطري الزعيرة.
كشفت التركيب الكيميائي للزيت العطري (HE)، على وجود 13 مكون. المكون الرئيسي هو carvacrol بمعدل 83.8٪، تليها p-cymène (8.15٪) و γ -terpinene 4.96٪.

فحص مضاد للفطريات تم إنجازه بعدة طرق مختلفة على سلالات فطر (9 الخمائر والفطريات 7). في الطور السائل، ونلاحظ ان عرض النشاط المثبطة ملحوظ على نمو جميع سلالات درس بأقطار من مناطق تثبيط تتراوح بين 53 و 85 مم. ، وتم الحصول على نتائج أفضل ل *candida tropicalis* بشكل خاص حيث لوحظ تثبيط كامل في أقل تركيز. وهذا التأثير المثبط هو "تعتمد على الجرعة." وهناك طريقة النوعي، تخفيف التركيز، تم استكشافها لتحديد الحد الأدنى المثبط تركيزات. جميع سلالات مثل الخميرة لها أدنى تركيز، من أجل من 0.3 mg/ml، إلا *rhodotorula sp* (0.15 mg/ml).

لاستكشاف إمكانات المضادة للالتهابات الموضعية قمنا بإجراء فحص النشاط الموضعي على أذن الفأر بدهن جرعات مختلفة من الزيت العطري. وقد أكد هذا النشاط أيضا على المستوى الخلوي، من خلال دراسة المرضية.

وخلص القول، فإن النتائج تشير إلى احتمالات تطبيق الأدوية من جوهر الزعتر مشترك في الوقاية علاج الالتهابات الفطرية والحالات الالتهابية المحلية.

كلمات البحث: antifongique, anti-inflammatoire topique, huile essentielle, carvacrol, *thymus vulgaris*

INTRODUCTION

On recherche depuis de nombreuses années, dans l'industrie pharmaceutique, des substances permettant de traiter les infections microbiennes et les pathologies inflammatoires. Il demeure intéressant de disposer de nouveaux produits à visée thérapeutique, notamment pour des affections modérées de ce type. Cependant et face au problème soulevé depuis plusieurs années par la résistance des microbes aux antifongiques ou encore les effets indésirables des anti-inflammatoires conventionnelles, la seule alternative fiable à l'usage de ces médicaments synthétiques semble être celle des molécules naturelles bioactives, à l'exemple des huiles essentielles (HE). Connue de façon empirique depuis des siècles, leur efficacité anti-infectieuse et thérapeutique a été scientifiquement démontrée *in vitro* et *in vivo* (Inouye et Abe, 2007 ; Goetz et Ghedira, 2012 ; Souza *et al.*, 2014).

De plus, l'étude de ces HE est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels de domaines tels que la pharmacognosie et la microbiologie. Cela tient principalement au fait que le règne végétal est une source présumée inépuisable d'une immense variété de médicaments potentiels, tout en étant accessible, y compris dans les pays en voie de développement. De nombreux travaux, essentiellement de laboratoire, sont venus renforcer les résultats des bienfaits thérapeutiques des HE et expliquer les modes d'actions de certains de leurs composants (De Billerbeck, 2007 ; Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2013). Depuis, l'utilisation des HE s'est développée jusqu'à devenir, depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médication de synthèse.

De nombreux végétaux sont connus pour leur activité thérapeutique, c'est le cas en particulier du thym commun (*Thymus vulgaris* L.) (Stahl-Biskup et Sáez, 2003). De nombreuses études traitent de l'activité antimicrobienne de l'essence aromatique de cette plante à parfum, qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés de microbiologie ou encore présentées lors des congrès d'aromathérapie scientifique. Utilisée pour ses vertus médicinales, notamment antitussives et expectorantes, l'essence de cette plante n'en a pas moins des propriétés antispasmodiques, vasodilatatrices (en application externe), tonique (et neurotonique psychique), astringentes, immunostimulante et vermifuges (Stahl-Biskup et Sáez, 2003 ; Giordani *et al.*, 2004 ; Goetz et Ghedira, 2012 ; Fachini-Queiroz *et al.*, 2012 ; Pinto *et al.*, 2013).

Bien que les vertus thérapeutiques de l'essence de cette plante aromatique et médicinale (PAM) aient été cataloguées, très peu sont les préparations pharmaceutiques qui ont été commercialisées de nos jours (Goetz et Ghedira, 2012). Dans le contexte socio-économique des pays en voie de développement comme l'Algérie, l'étude des PAM en général et des thym odorants, en particulier, peut aboutir à l'obtention de réponses thérapeutiques adéquates et de faibles prix, joignant à une efficacité scientifique prouvée et une acceptabilité culturelle optimale.

Thymus vulgaris est une plante largement répandue en Algérie, utilisée dans le traitement de certaines infections ou pathologies hivernales, en raison de ces multiples bienfaits thérapeutiques (**Cheurfa et al., 2013 ; Sidali et al., 2014**). C'est dans le sillage de disposer d'un nouveau produit naturel, exhibant une activité anti-inflammatoire et/ou antifongique et pouvant ne pas présenter d'effets secondaires notables, que s'est inscrite cette étude. Ce dernier travail fait apparaître des molécules « aromatiques bioactives » issues d'une plante à parfum, *Thymus vulgaris*, référencée par la médecine traditionnelle et supposant ainsi des activités biologique et pharmacologique intéressantes.

De ce fait, l'objectif assigné à notre travail consiste à asseoir, *in vitro*, le pouvoir antifongique de la fraction aromatique du thym vulgaire en utilisant plusieurs méthodes qualitative (aromatogramme et microatmosphère) et quantitative (détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)). De plus et pour valider les propriétés curatives de cette fraction aromatique, l'activité anti-inflammatoire a été explorée, *in vivo*, via le test de l'œdème des oreilles induit par l'huile de croton. En outre, la composition chimique de l'essence a été déterminée, par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM), afin d'établir le profil chromatographique et le chémotype de l'essence de cette plante à parfum.

1.1. Condensé historique

Présent sur l'ensemble du bassin méditerranéen, le thym commun (*Thymus vulgaris*) a été utilisé depuis la très haute Antiquité. L'origine « Thymus » vient du grec thumon qui signifie « parfum », dû à l'odeur agréable que dégage la plante naturellement ou lorsqu'on la fait brûler. Les Romains l'appelaient *sepyllum*. Ils en diffusèrent l'usage en Europe, via la fabrication de nombreux cosmétiques (eau de toilette, baume censé retarder le vieillissement) et ils s'en servaient aussi pour purifier leurs pièces d'habitation et pour "donner du parfum aux fromages et liqueurs". Les Égyptiens de la haute Antiquité utilisaient le thym pour l'embaumement des morts. Les Grecs le brûlaient comme offrande aux dieux dans les temples ou sur les places publiques. On pensait à cette époque que cette plante était source de courage. Ils en parfumaient leurs plats et l'utilisaient dans leur bain pour ses propriétés stimulantes (Goetz et Ghedira, 2012).

C'est surtout à partir du Moyen Age que ses vertus médicinales commencent à être reconnues, notamment pour lutter contre les épidémies, principalement de lèpre ou de peste. Le thym est déjà cité comme médicament par d'éminents savants de l'époque (Galien, Aetius, Dioscoride et Pline). On le retrouve avec certitude chez Albertus Magnus, Sainte Hildegarde de Bingen et Trotula, qui célébrait ses vertus en particulier comme remède contre la coqueluche. A partir du XVI^e siècle, il est signalé dans les traités de médecine pour guérir une large variété d'affections. Il faudra attendre le XIX^e siècle toutefois pour que ses composants actifs soient répertoriés ; le thym servant au siècle précédent surtout à des fins aromatiques (Stahl-Biskup et Sáez, 2003).

De nos jours, l'huile essentielle (HE) de thym et le thymol, un de ses composants, sont couramment utilisés pour la confection de savons et de cosmétiques divers. En Amérique du Nord, l'une des marques les plus populaires de rince-bouche (Listerine®) contient du thymol comme ingrédient principal. Il entre aussi dans la composition de quelques dentifrices. En Europe, le thym compte encore parmi les plantes les plus fréquemment recommandées contre la toux et l'inflammation des voies respiratoires (Basch *et al.*, 2004 ; Fabio *et al.*, 2007).

1.2. Description botanique

Thym vulgaris est une plante odorante de la famille des Lamiacées qui comporte plus de 300 espèces. Plante aromatique originaire du bassin méditerranéen, *T. vulgaris* se présente sous la forme d'un sous-arbrisseau, de 10-30 cm, d'un vert blanchâtre ou grisâtre, de type vivace et touffu, à tiges quadrangulaires et ligneuses et à feuilles sessiles (Figure 1.1). Ces dernières sont assez petites, de forme lancéolée et de couleur gris-vert. Sa fleur est petite, de 4 à 6 millimètres, et se regroupe en épis foliacés visible, de juin à octobre, avec une teinte rosacée. La floraison a lieu de mai à juillet (Stahl-Biskup et Sáez, 2003 ; Basch *et al.*, 2004 ; Goetz et Ghedira, 2012).

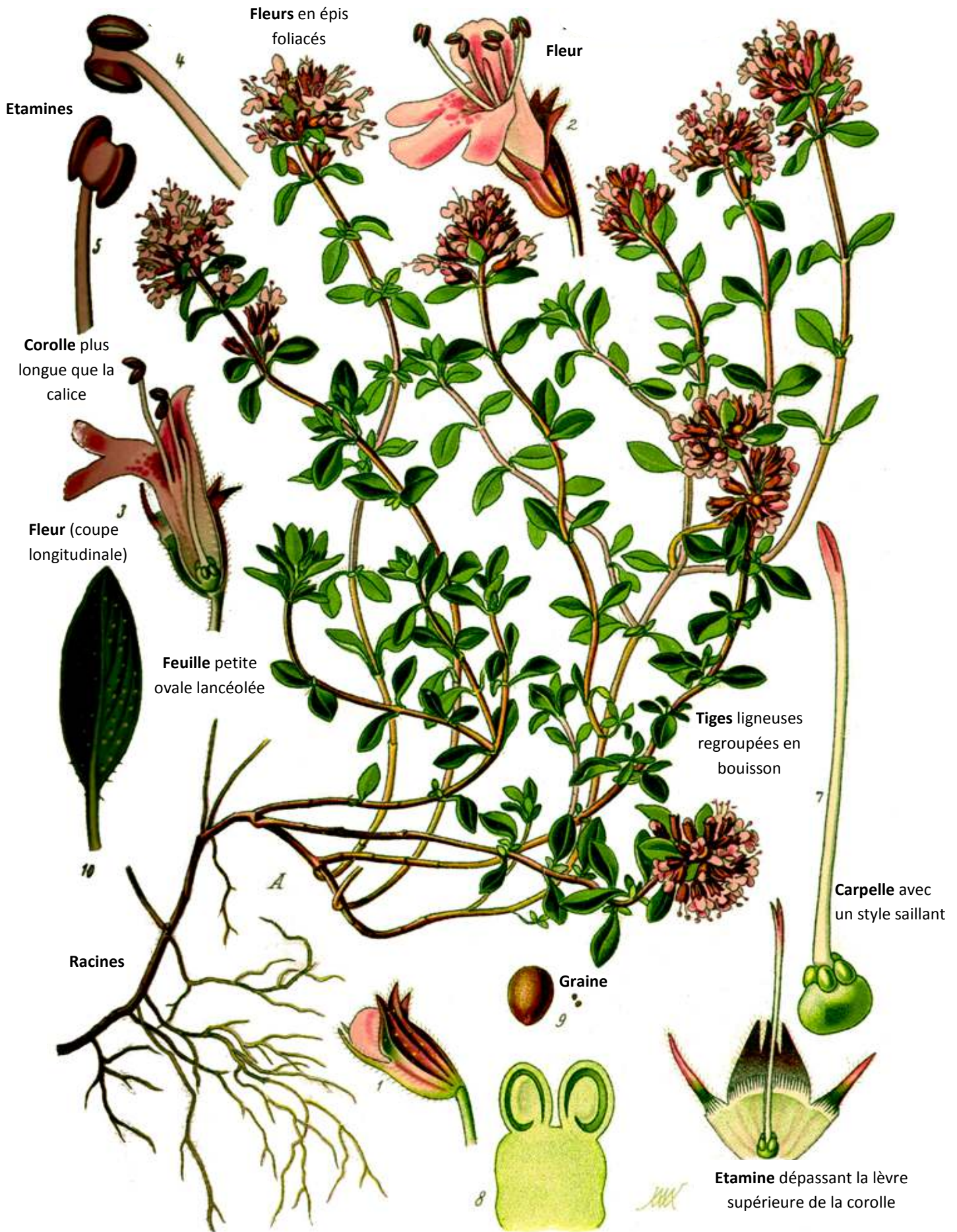


Figure 1.1. Illustration de l'aspect morphologique du thym commun (*Thymus vulgaris* L.)
(images.google.fr)



Champs de culture du Thym
(original, 2015)

1.3. Place dans la systématique

Le thym commun appartient à la famille des Lamiacées. C'est l'une des familles botaniques les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antioxydant et antibactérien. Elle regroupe entre 200 et 250 genres et entre 3200 et 6500 espèces (**Basch et al., 2004**). *Thymus* est l'un des huit genres les plus importants en ce qui concerne le nombre d'espèces chez la famille Labiatae, bien que le nombre d'espèce de ce genre change selon le point de vue taxonomique (**Goetz et Ghedira, 2012**).

La systématique de *Thymus vulgaris* (**Tableau 1.1**) se réfère à la classification botanique antérieure (**Goetz et Ghedira, 2012**).

Tableau 1.1. Classification botanique du *Thymus vulgaris* (**Goetz et Ghedira, 2012**).

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Labiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus vulgaris</i> L.

1.4. Dénominations internationales

Plusieurs dénominations et synonymes ont été attribués au thym des jardins (**Goetz et Ghedira, 2012 ; Braun et Cohen, 2015**). Nous citerons quelques exemples :

- Français : thym vulgaire, thym des jardins, farigoule, barigoule, thym commun.
- Anglais: common thyme, garden thyme, culinary thyme, french thyme.
- Espagnol: farigola, tem, timó, tomillo común.
- Portugais: timo, tomilho, tomilho-vulgar.
- Italien: timo, timo maggiore, sermollino.
- Arabe: saatar, Zaatar, الزعتر

1.5. Étymologie

Le terme « thym » est apparu dans la langue française au XIII^{ème} siècle, d'abord sous la forme de « tym ». Selon certaines sources, il est dérivé du latin *thymus*, qui l'a emprunté au grec *thumos*, signifiant, de façon quelque peu obscure, « grosseur ou loupe » (par référence à la glande, le thymus). D'autres pensent plutôt que le mot vient du grec *thymos* ou *thyein*, qui signifie « fumée », par allusion au fait qu'il était jadis brûlé comme encens et qu'on lui attribuait alors le pouvoir d'éloigner les créatures venimeuses ; ou encore de *thio* qui signifie « je parfume ».

D'autres, enfin, font dériver le mot du grec *thumus*, qui signifie « courage », car la plante étant jadis considérée comme revigorante. On prétend aussi que ses origines viendraient tout d'abord de l'Égypte ancienne (**Basch et al., 2004 ; Goetz et Ghedira, 2012**).

1.6. Habitat et répartition géographique

Le thym commun est originaire des pays méditerranéens et balkaniques et du Caucase; on le cultive maintenant dans de nombreuses régions subtropicales. On le trouve surtout sur les sols calcaires (basiques) secs : guarrigues, bordures de haies ou de fossés, pourtour de vignes, zones pâturées par les chèvres et les moutons qui ne l'apprécient guère et ainsi, indirectement, assurent son extension en taches monospécifiques. Comme le thym commun s'adapte à de nombreux climats et sols et qu'il possède un arôme agréable, on le cultive dans le monde entier comme aromate. Au nord des Alpes, il ne résiste pas à l'hiver. Les espèces adaptées aux climats rudes sont le thym d'hiver, le thym de montagne et le serpolet (**Ezz et al., 2009 ; Goetz et Ghedira, 2012**).

- Dans le monde

Il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée. C'est une plante très répandue dans le Nord-Ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye) (**Figure 1.2**). Elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du Sud-Ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya (**Stahl-Biskup et Sáez, 2003**).

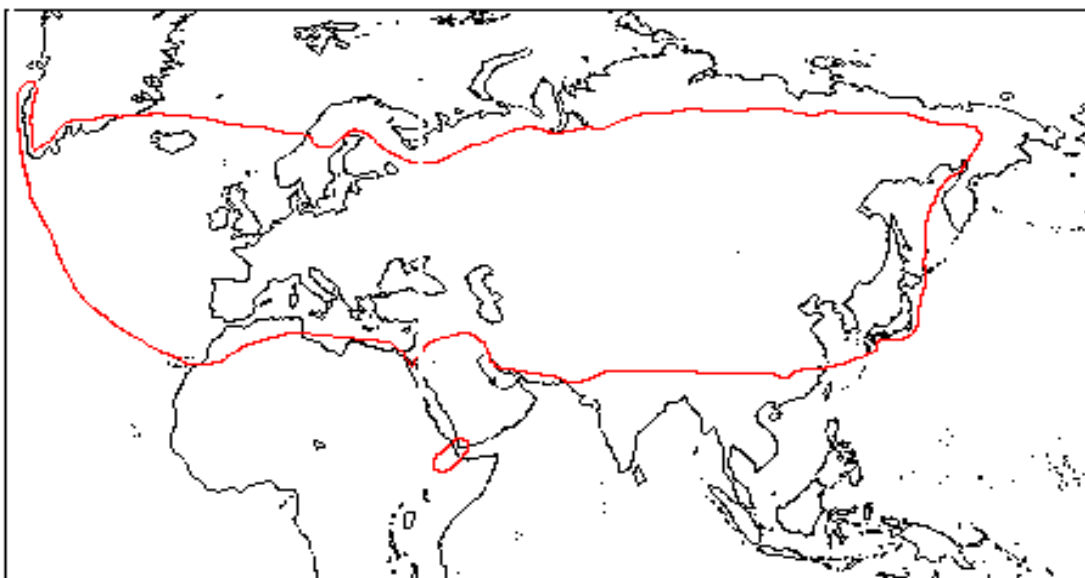


Figure 1.2. Répartition du Thym dans le monde (**Stahl-Biskup, 1991**).

- En Algérie

Le genre *Thymus* inclut environ 300 espèces à travers le monde dont 12 localisées en Algérie et 9 d'entre elles sont endémiques. Ces espèces sont réparties du Nord algérois à l'Atlas saharien, et du Constantinois à l'Oranais (**Quezel et Santa, 1963**).

1.7. Culture et période de récolte

Le thym des jardins pousse bien sur des endroits naturels, sur sols légers et calcaires, mais il prospère tout aussi bien sur sols fertiles argileux mais non détrempés. Il nécessite des endroits bien ensoleillés et supporte relativement bien la sécheresse. C'est d'ailleurs sur sols pauvres (maquis, rocaïlle de garrigue) que se développe le mieux son arôme. Dans les endroits de fortes gelées, une protection est recommandée durant l'hiver. Sa multiplication se fait par semis superficiel (germination à la lumière), réalisé mi-avril ou plus rarement en août, en rangées écartées d'environ 20 à 30 cm, de préférence sur sol léger et sablonneux (**Stahl-Biskup et Sáez, 2003 ; Ezz, 2009**).

Deux récoltes peuvent être entreprises, une en fin mai, début juin au commencement de la période de floraison, l'autre en septembre. Il est préférable de réaliser la cueillette après la rosée du petit matin et avant les heures les plus chaudes ; où la plante aura évacué le maximum d'humidité et n'aura pas évaporé son HE. On peut constater, que pour une récolte dans un champ, l'utilisation d'une fauche mécanique est avantageuse. Le temps consacré à la cueillette est ici amortie par du matériel adéquat (**Basch et al., 2004**).

1.8. Composition et Principes actifs

En pharmacopée, il s'agit exclusivement de l'utilisation des parties aériennes du thym et, surtout, de la feuille et de la fleur, qui sont alors séchées. Les composants du thym sont assez nombreux, en particulier dans ses HE : thymol, un anti-infectieux puissant ; géraniol, antifongique et antiviral (pour la peau) ; linalool, antifongique (pour les affections de type candidose) et vermifuge. Les HE contiennent différents composants, et en particulier le *p*-cymène (antalgique) (**Clarke, 2009**). Le thym contient encore des flavonoïdes (apigénol et lutéolol). Ces derniers ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes. Le thym frais est aussi une source importante de vitamine C, et le thym séché de calcium, de manganèse et de vitamine K (**Guillen et Manzanos, 1998 ; Stahl-Biskup et Sáez, 2003 ; Clarke, 2009**).

1.9. Bienfaits et vertus thérapeutiques de la plante

1.9.1. Utilisation interne

La plante soulage un large panel de pathologies respiratoires : calme les quintes de toux, notamment dans les affections de type coqueluche, bronchite, pleurésie, ainsi que d'autres de la sphère pulmonaire (emphysème) par son effet spasmolytique. Elle participe à diminuer les sécrétions nasales ou rhinorrhées. Le thym est aussi d'une bonne aide pour les asthmatiques car il permet de dégager plus facilement les voies respiratoires. C'est d'ailleurs un bon stimulant pour les bronches (**Pinn, 2001 ; Basch, 2004 ; Peter, 2006**).

Antiseptique et antifongique réputé, le thym commun soulage les inflammations de la sphère bucco-pharyngée, caries, soins dentaires divers, sous forme de bains de bouche. L'efficacité antibactérienne du thym a été prouvée dans la lutte contre *Helicobacter pylori*, une bactérie souvent liée aux ulcères de l'estomac (**Esmaeili et al., 2012**). Le thym a longtemps été prescrit aux enfants comme puissant vermifuge afin d'éliminer les parasites.

De plus, ses vertus spasmolytiques sont salutaires dans le soulagement des dérèglements intestinaux tels que diarrhée, ballonnements, flatulences, colopathies diverses. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) reconnaît l'usage du thym "contre les dyspepsies (digestion difficile) et autres désordres gastro-intestinaux". Le Thym est aussi très utile dans le traitement des gastro-entérites sous forme d'infusions (**Babaei et al., 2008 ; Direkvand-Moghadam et Khosravi, 2012**).

1.9.2. Utilisation externe

Sur de nombreuses pathologies dermatologiques, ses vertus antivirales, antimicrobiennes et antiseptiques sont mises à profit dans le traitement des mycoses, des plaies, de la gale, de l'herpès et, globalement, d'un large panel d'affections cutanées allant jusqu'au zona (**Dursun et al., 2003**). L'OMS reconnaît ses propriétés antiseptiques et cicatrisantes sur les plaies superficielles de la peau et contre les irritations de la bouche (inflammation des amygdales, laryngite) (**Goetz, 2004 ; Rhind et Pirie, 2012**). Certaines variétés de thym, dont le thym à *p*-cymène, sont utilisées afin de soulager les affections ostéo-articulaires telles que les rhumatismes ou l'arthrose (**Stahl-Biskup et Sáez, 2003**).

1.9.3. Recherches cliniques

Certaines propriétés pharmacologiques du *Thymus vulgaris* et de ses différents extraits, en particulier l'HE, ont été largement étudiées et validées. En plus de leurs nombreuses utilisations traditionnelles, la plante et ses extraits ont trouvé de nombreuses applications industrielles (comme additifs alimentaires) et médicinales (**Braun et Cohen, 2015**). Les recherches actuelles réalisées sur les effets des extraits aromatiques de cette plante sur différents systèmes, *in vitro* et *in vivo*, ont ressorti plusieurs effets de grande importance pour la médecine, la pharmacie et l'industrie moderne, parmi les quelles nous citerons les plus importants :

- **Bronchite** : Au cours d'une étude ouverte (les participants savaient ce qu'ils prenaient), plus de 7 000 patients souffrant de bronchite aiguë ont testé un sirop (Bronchipret®) composé d'extraits de thym (*T. vulgaris*) et de racine de primevère officinale (*Primulae radix*). Celui-ci s'est montré au moins aussi efficace que la N-acétylcystéine et que l'ambroxol, deux médicaments qui fluidifient les sécrétions bronchiques (**Ernst et al., 1997**). Il a aussi entraîné moins d'effets indésirables. Trois essais plus récents ont confirmé l'efficacité de la combinaison thym-primevère pour réduire modérément la durée et l'intensité des symptômes de la bronchite (**Gruenwald et al., 2004 ; Gruenwald et al., 2005 ; Kemmerich, 2006**).

Deux essais cliniques ont indiqué que les sirops Bronchipret Saft® et Weleda Hustenelixier® étaient efficaces pour soulager la toux (**Buechi et Vogelin, 2005 ; Kemmerich, 2005**). Fabriqués en Allemagne, ils sont composés d'un extrait de thym et d'un extrait de feuilles de lierre grim pant (*Hedera helix*). Par ailleurs, l'efficacité et l'innocuité du produit Bronchipret (en traitement de 10 jours) ont été confirmées par une étude de pharmacovigilance menée auprès d'un millier d'enfants et d'adolescents (**Marzian, 2007**). En aromathérapie, l'essence de *T. vulgaris* a de nombreux usages, dont la prévention et le traitement des infections respiratoires (**Baudoux, 2001**).

- **Plaque dentaire :** Les seules études cliniques dont on dispose pour évaluer l'efficacité du thym en matière d'hygiène buccale viennent des nombreux essais cliniques menés sur un rince-bouche populaire (Listerine®). Ce rince-bouche renferme de l'eucalyptol (extrait de l'eucalyptus) et du thymol (extrait du thym) (Fine *et al.*, 2000 ; Pan *et al.*, 2000). L'efficacité de ce produit pour combattre la plaque dentaire et les bactéries qui causent la carie et la gingivite serait attribuable, notamment, à l'action du thymol (Shapiro et Guggenheim, 2000).

- **Anxiété :** L'un des constituants du thym, le carvacrol, pourrait avoir des effets relaxants sur les personnes atteintes d'anxiété (Komaki *et al.*, 2015). Une étude récente (Melo *et al.*, 2010) effectuée sur des animaux a démontré les propriétés anxiolytiques de ce composé. Il provoquerait l'activation des récepteurs GABA (Mohammadi *et al.*, 2001), des sites de reconnaissances de l'organisme qui inhibent le système nerveux. Ce sont ces mêmes récepteurs qui sont notamment les cibles des benzodiazépines (des médicaments anxiolytiques) et de l'alcool.

- **Désintoxication :** Une étude a été réalisée sur des souris de laboratoire pour constater l'effet thérapeutique des extraits aqueux de thym (*Thymus vulgaris*) et de gingembre (*Zingiber officinalis*) sur le foie endommagé par l'abus d'alcool. Les résultats de cette enquête ont révélé que les extraits de thym et de gingembre exercent des effets antioxydants et ont le pouvoir de désintoxiquer le foie. Les naturopathes prescrivent souvent une tisane de thym aux patients qui subissent une chimiothérapie dans le but de protéger le foie contre l'effet agressif des médicaments (action hépato-protecteur du thym) (Shati et Elsaid, 2009).

1.10. Précautions d'emploi et effets secondaires

Les effets indésirables du thym commun sont très rares: allergie de la peau, réaction d'hypersensibilité, nausées ou douleurs abdominales. A titre de précaution, l'usage du thym est déconseillé chez les femmes enceintes, celles qui allaitent et les enfants de moins de quatre ans.

Les personnes sous traitement anticoagulant devront veiller à avoir une consommation relativement faible de thym, afin de limiter les apports de la vitamine K présente dans cette plante et qui participe au processus de coagulation du sang (Martínez-González *et al.*, 2007).

1.11. Huile essentielle de *Thymus vulgaris*

1.11.1. Production et composition

L'obtention de l'HE de thym vulgaire se fait à partir de la distillation de ses sommités fleuries et de ses tiges fleuries. L'essence aromatique est habituellement incolore. Son odeur est assez chaude et puissante, mêlant des fragrances épicées et herbacées (Badi *et al.*, 2004).

La teneur en HE de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré. Les feuilles de thym contiennent 0,5 à 2,5 % d'HE dont la composition varie beaucoup selon la zone de culture, la variété (cultivar) et surtout les conditions climatiques (chaud, froid, sec ou humide). Ce sont les variétés chémotypes. On distingue 7 races chimiques ou chémotypes de thym: thymol, carvacrol, linalool, thuyanol, α -terpinéol, géraniol et *p*-cymène (Keefover-Ring *et al.*, 2009).

1.11.2. Notion de chémotypes

Différents facteurs tels que l'ensoleillement, l'altitude, la nature et la composition du sol, peuvent influencer sur la biosynthèse végétale. Ainsi, les composés aromatiques ne sont pas immuables pour une même plante. Afin de différencier dans une même espèce cette variation chimique, on utilise le terme de chémotype ou race chimique.

Cette notion de chémotype est devenue essentielle et fondamentale en aromathérapie car les indications thérapeutiques qui découlent de ces divers éléments chimiques peuvent être très différentes (**Pibiri, 2006**).

Parmi les HE distillée du thym vulgaire, 4 ressortent du lot:

- L'HE à thymol (**Figure 1.3**) est réputée pour ses propriétés antibactérienne et antifongique. Elle est très souvent citée pour le traitement des mycoses et des parasites cutanés. Dermocaustique, cette huile doit être impérativement diluée avant d'être appliquée sur la peau.

- L'HE à thuyanol, naturellement riche en thuyanol (20 à 45 % selon les provenances), est réputée être bactéricide, virucide puissante, immunostimulante, stimulante hépatocytaire, neurotonique, hormon-like et aide à réguler le taux de sucre dans le sang. Elle est particulièrement indiquée pour le traitement des problèmes de foie, d'intoxication alimentaire ainsi que des problèmes de la sphère bucco-dentaire et de la sphère ORL. Contrairement à l'huile à thymol, cette essence est non agressive et peut être utilisée pure voie externe. Elle est la plus chère aussi.

- L'HE à linalool (65-85%) a des propriétés proches de celle à thymol. Elle est en effet un antiseptique général puissant. Son intérêt réside dans le fait qu'elle possède des propriétés supplémentaires : elle est reconnue être vermifuge, neurotonique et utérotonique. Son parfum est plus doux et plus fleuri que les deux autres HE.

- L'HE à géraniol (11-26% de géraniol et 14-40% d'acétate de géranyle) a des propriétés proches du géranium (*Pelargonium asperum*) ou de citronnelle (*Cymbopogon martinii*). Outre ses propriétés antimicrobienne et antivirale, cette essence est fluidifiante et expectorante. C'est aussi un utérotonique, neurotonique et cardiotonique (**Stewart, 2005 ; Baudoux et Zhiri, 2009**).

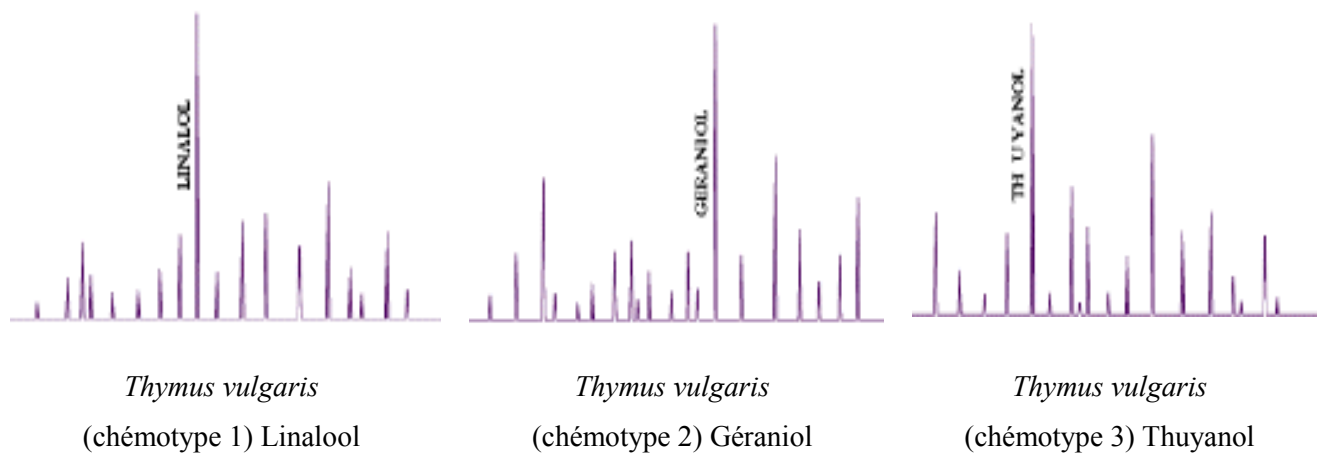


Figure 1.3. Exemple de chromatogrammes montrant trois chémotypes différents de l'essence du thym commun. (Pibiri, 2006)

1.11.3. Bienfaits thérapeutiques de l'huile essentielle

L'HE du thym vulgaire a des propriétés antispasmodiques, vasodilatatrices (en application externe), anti-infectieuses, antimicrobiennes, antivirales, fongicides, parasitocides, antiseptiques, fortifiantes, antalgiques, et régulatrices de l'appétit (Rota *et al.*, 2008 ; Nikolić *et al.*, 2014). Elle est aussi expectorante, astringente, antitussive, vermifuge, tonique (et neurotonique psychique), immuno-stimulante et ré-équilibrante (Vigo *et al.*, 2004).

Plus généralement, l'huile est bénéfique lors de coup de froid et d'infections respiratoires (bronchite, otite, rhinite, grippe, sinusite, rhume), mais aussi lors de faiblesse des poumons ou de l'estomac, d'asthme, de tuberculose, d'infection urinaire, de candidose, de fatigue nerveuse, d'obésité, de déprime et de dépression, de vers intestinaux et d'anémie. Véritable battante contre les champignons et les infections, l'HE de thym à thymol lutte de manière efficace contre les maladies infectieuses comme l'herpès ou les aphtes. Ses propriétés antifongiques stoppent la propagation des champignons et aide à la cicatrisation (Stahl-Biskup et Sáez, 2003 ; Basch *et al.*, 2004 ; Goetz et Ghedira, 2012 ; Braun et Cohen, 2015).

1.11.4. Contre-indications de l'huile essentielle

L'utilisation de l'essence aromatique du thym commun est déconseillée pendant toute la période de la grossesse et durant l'allaitement. Elle est aussi proscrite chez les personnes épileptiques. En outre, elle peut provoquer des irritations cutanées ou des allergies ; il est donc nécessaire de vérifier la tolérance à cette huile en l'appliquant en faible dose (Goetz et Ghedira, 2012).

Notre étude s'est étalée sur une période de 6 mois (Mars-Aout 2015). Les différentes expérimentations ont été effectuées au niveau des structures suivantes :

- Laboratoire Mycologie de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA) pour l'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle (HE) du thym commun *in vitro*.
- Service de Pharmaco-toxicologie du Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP) d'Alger, dans le but d'asseoir le pouvoir anti-inflammatoire de l'huile *in vivo*.
- Laboratoire d'Anatomo-Pathologie du Service Vétérinaire de l'IPA (Annexe d'El Hamma, Alger) où l'étude histopathologique a été effectuée sur les oreilles des souris.
- Centre de Recherche en Analyses Physico-chimiques (CRAPC) d'Alger afin de déterminer la composition chimique de l'HE et son profil chromatographique.

2.1. Huile essentielle

L'huile essentielle du thym commun (*Thymus vulgaris*) a été fournie par la société « Ziphee.Bio » spécialisée dans la production des HE et des engrais biologiques, sise à Lakhdaria (Bouira). L'HE a été extraite à partir de la partie aérienne fraîche de la plante (feuilles et tiges) durant la période de floraison (juin 2013). Le matériel végétal provient des montagnes de Bouira. Le procédé d'extraction utilisé est l'entraînement à la vapeur d'eau conduit à échelle industrielle. Aussi, l'HE est certifiée « 100% naturelle » car n'ayant été additionnée ou mélangée à aucun solvant organique durant la phase de production. Elle a été conservée dans des flacons stériles teintés à 4°C et à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail, pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation ou de contamination.

2.2. Matériel animal

Les différentes analyses pharmacologiques ont été effectuées sur des souris de souche NMRI (Naval Medical Research Institute) provenant de l'animalerie du LNCPP d'Alger. Au total, une centaine de souris, de sexe mâle et avec un poids moyen de 20 g, ont été utilisées. Ces animaux ont été stabulés dans des cages en plastique à une température ambiante et un éclairage de 12 heures par jour, avec un régime alimentaire de granulés d'origine ONAB et de l'eau de manière *ad-libitum*. L'expérience a porté sur des souris saines et adultes.

2.3. Milieux de cultures et agents chimiques

Lors du screening antimicrobien, nous avons utilisé des milieux de culture solides, en l'occurrence la gélose Sabouraud-Chloramphénicol (SAB) pour les levures et moisissures. Tous ces milieux de culture proviennent de l'IPA d'Alger.

Et afin de mener une étude comparative du pouvoir antifongique de la fraction aromatique du thym commun avec des produits de références, nous avons utilisé une solution antiseptique d'Hexomédine à 0.1% (Biopharm, Alger) comme contrôle positif.

L'huile de croton, le diméthyl sulfoxyde (DMSO), l'éther éthylique, l'éthanol, l'acétone et la pyridine ont été utilisés pour l'induction de l'inflammation topique au niveau des oreilles des souris. Ces produits proviennent de la société Sigma-Aldrich (Allemagne).

2.4. Souches microbiennes

L'activité antifongique de l'essence aromatique du thym commun a été évaluée sur 7 champignons filamenteux (moisissures) et 9 levures (**Tableau 2.1**). Ces souches ont été identifiées au niveau du service Mycologie de l'Institut Pasteur d'Alger. L'identification des champignons est principalement réalisée par examens macro et microscopique. Les souches fongiques ont été choisies, dans cette étude, sur la base de leur implication fréquente dans les infections humaines (infections cutanées, auriculaires, unguéales, vaginales et nasales). Elles ont été conservées et maintenues en vie, par des repiquages continus, sur des milieux de culture adéquats.

Tableau 2.1 : Souches fongiques utilisées dans le screening antimicrobien.

Souches levuriformes	Souches mycéliennes
<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Candida tropicalis</i> (Ct 1)	<i>Aspergillus flavus</i> (Af 1)
<i>Candida tropicalis</i> (Ct 2)	<i>Aspergillus flavus</i> (Af 2)
<i>Candida tropicalis</i> (Ct 3)	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Candida parapsilosis</i> (Cp1)	<i>Rhizopus</i> sp.
<i>Candida parapsilosis</i> (Cp 2)	<i>Fusarium</i> sp.
<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Rhodotorula</i> sp.	

2.5. Étude analytique de l'huile essentielle

2.5.1. Propriétés organoleptiques :

En concertation avec d'autres personnes, les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur et odeur) de l'essence du thym vulgaire ont été notées.

2.5.2. Analyses chromatographiques de l'huile essentielle

- **Conditions opératoires :**

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un Chromatographe en Phase Gazeuse, à régulation électronique de pression, de type Hewlett Packard (série HP 6890, Palo Alto, Californie, USA), équipé d'une colonne capillaire HP-5 (30 m x 0.25 mm) avec une épaisseur de film de 0.25 µm, d'un détecteur FID réglé à 280 °C et alimenté par l'Hélium et un injecteur *split-splitless* réglé à 250 °C. Le mode d'injection est *split*. Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de

1.7 mL.min⁻¹. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison d'une montée de 2 °C.min⁻¹. L'appareil est piloté par un système informatique de type « *HP Chem Station* », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs Indices de Rétention (IR). Cette dernière est réalisée sur un Chromatographe en Phase Gazeuse de type Hewlett-Packard (série HP 6890) couplé avec un Spectromètre de Masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0.25 mm), l'épaisseur du film est de 0.25 µm. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison de 2 °C.min⁻¹. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1.2 mL.min⁻¹. Le mode d'injection est *split* (rapport de fuite : 1/70).

L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse (Wiley7, NIST 2002). L'identification des constituants est basée sur la comparaison de leurs spectres de masse (CG-SM) respectifs avec les spectres de la bibliothèque et de la bibliographie (Adams, 2007) et sur la base de calcul des IR. L'IR d'un composé A est indépendant du débit, de la longueur de la colonne et de la quantité injectée. Il dépend de la phase stationnaire et de la température. Les IR sont calculés selon la formule suivante :

$$IR = 100n + \left[\frac{TR_c - TR_n}{TR_{(n+1)} - TR_n} \right] \times 100$$

n : Nombre d'atomes de carbone de l'alcane élué avant le composé ;

TR c : Temps de rétention du composé ;

TR n : Temps de rétention de l'alcane à n atomes de carbone élué avant le composé ;

TR (n+1) : Temps de rétention de l'alcane à n+1 atomes de carbone élué après le composé.

2.6. Evaluation de l'activité antifongique *in vitro*

L'évaluation des propriétés antifongiques consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes soumis à l'HE du thym commun. Dans un premier temps, Deux méthodes qualitatives et complémentaires (aromatogramme et microatmosphère) ont été examinées dans ce screening antimicrobien afin de sélectionner les souches les plus sensibles à l'action inhibitrice de l'HE. Une seule méthode quantitative (méthode de dilution en milieu gélosé) a été abordée sur les souches sensibles sélectionnées afin de déterminer les CMI.

2.6.1. Technique de l'aromatogramme (diffusion en milieu solide)

Cette méthode, utilisée par certains auteurs (Tyagi et Malik, 2011), est la technique que nous avons utilisée pour évaluer, dans un premier temps, l'activité antifongique de l'HE. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des HE sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte Pétri. Elle nous permet de mettre en évidence l'effet antifongique de l'HE et en déduire ainsi la résistance ou la sensibilité de ces champignons vis-à-vis de l'extrait aromatique. Dans cette méthode (Figure 2.1), nous avons utilisé des disques de 9 mm de diamètre (Antibiotica-Testblattchen, Schleicher & Schuell,

D-3354, Dassel, Allemagne) que nous avons imprégnés d'une certaine quantité d'HE. Le disque sera déposé au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche fongique. L'étude du pouvoir antimycélien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des antibiotiques (ATB) par des extraits aromatiques.

Dans notre étude, nous avons testé l'activité antifongique de l'HE en imprégnant les disques, séparément, par 3 doses croissantes à savoir 20, 40 et 60 mg d'HE par disque. Ceci a été fait dans le but d'apprécier l'action « Dose-Dépendante » de l'HE sur l'inhibition de la croissance des isolats fongiques. Chaque boîte Pétri est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à température adéquate (3 à 5 jours pour les levures et les moisissures). L'essence diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les champignons croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'essence aromatique suffisante qui inhibe leur croissance. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque et dont le Diamètre de la Zone d'Inhibition (DZI) est mesuré et exprimé en mm. Une 2^{ème} répétition a été faite pour chaque souche afin de calculer la moyenne des DZI.

Aussi et pour chaque souche fongique, des témoins positifs ont été réalisés en appliquant, dans les mêmes conditions citées précédemment, des disques imprégnés d'une solution d'héxomédine (antiseptique local) qui vont servir comme référence afin de comparer leur pouvoir inhibiteur avec notre échantillon d'HE.

2.6.2. Technique de microatmosphère (diffusion en phase vapeur)

Nous avons utilisé cette méthode dans le but d'apprécier les propriétés inhibitrices de la phase volatile de l'HE. Les auteurs qui se sont penchés sur l'activité de la phase gazeuse (**Figure 2.2**) sont encore peu nombreux (**Tyagi et Malik, 2011**). La différence entre cette méthode et l'aromatogramme réside dans la position du disque imprégné. Ce dernier est déposé au centre du couvercle de la boîte Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. De la même manière que l'aromatogramme, nous avons appliqué 3 doses croissantes en HE. En premier lieu, 20 mg d'HE est déposée sur un disque de papier filtre de 20 mm de diamètre. Dans le 2^{ème} essai, un disque de 40 mm a été imprégné par 40 mg d'HE alors que pour le dernier, un disque de 60 mm a été chargé par 60 mg d'HE. Le diamètre du disque diffère selon la quantité d'HE à imprégner afin d'obtenir un bon étalement et, par conséquent, une meilleure évaporation de l'HE.

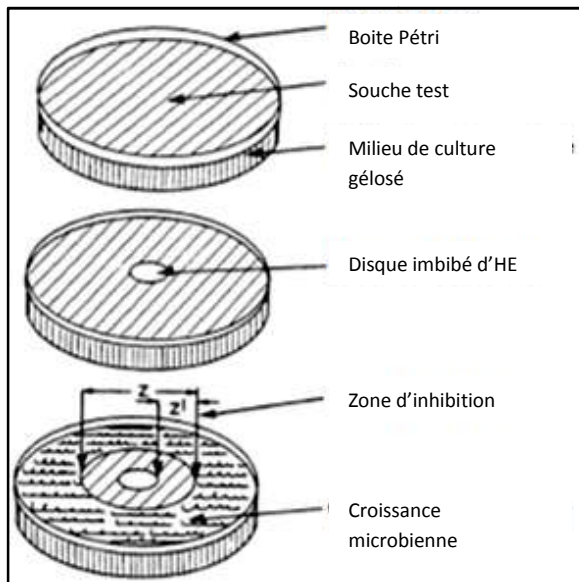


Figure 2.1. Illustration de la méthode de l'aromatogramme (Zaika, 1988)

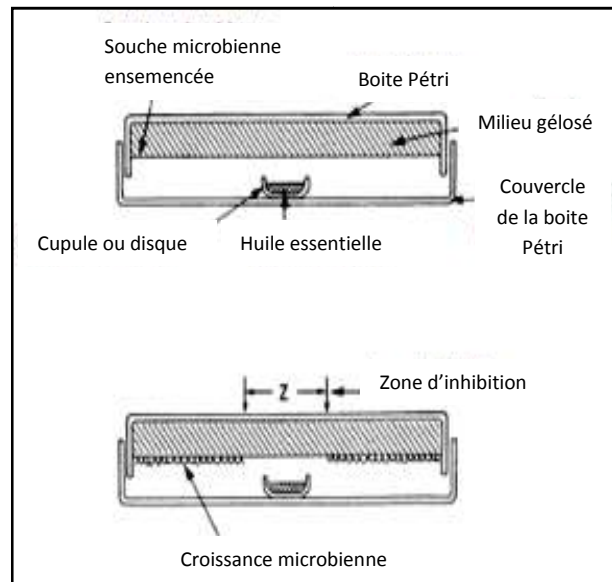


Figure 2.2. Illustration de la méthode de Microatmosphère (Zaika, 1988)

La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats ont été menés de la même manière que la première méthode. La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve à température adéquate. Il se produit une évaporation des substances qui, en contact avec les germes ensemencés, va inhiber leur croissance. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance fongique se traduit par une zone translucide sur la gélose, de contour plus ou moins nette et à tendance circulaire.

A noter que pour chaque souche testée, une boîte témoin est ensemencée dans les conditions de l'expérience, sans disque. Elle nous renseigne sur l'homogénéité du tapis mycélien.

2.6.3. Détermination des CMI par macrodilution en milieu gélosé

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000) pour évaluer la sensibilité des germes micro-aérophiles aux agents antimicrobiens. Elle consiste à ensemencer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en HE dispersée de façon homogène et stable dans le milieu de culture. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture gélosés. Ce problème a été résolu, en partie, par l'utilisation d'un agent dispersant et solubilisant inerte, en l'occurrence le Diméthylsulfoxyde (DMSO).

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte.

Une série de dilution d'HE est préparée avec un intervalle de concentrations qui varie entre 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ à 0.001 $\mu\text{L}/\text{mL}$. La réalisation des dilutions se fait en ajoutant une quantité de 0.5 mL d'HE à 50 mL de milieu de culture (SAB) en surfusion (45°C), supplémenté en DMSO (0.12 %, v/v). La préparation obtenue correspond à la dilution mère (1%). Une dilution en série, de 2 en 2, est effectuée dans du milieu gélosé en surfusion, de manière à obtenir une gamme de concentration en HE qui varie entre 1% à 0.0001%.

L'ensemencement de chaque milieu sera fait par touche à l'aide d'un écouvillon stérile. Les boîtes Pétri seront incubées à 25°C pendant 48-72hh. Cette technique est économique puisqu'elle nous a permis de tester plusieurs souches microbiennes dans la même boîte. Un témoin de la croissance fongique, pour lequel une certaine quantité de l'inoculum standardisé déposé dans du milieu SAB-DMSO (0.12 %, v/v), a été réalisé.

La lecture des résultats se fait visuellement, en observant l'apparition d'une éventuelle croissance microbienne, en comparaison avec une boîte témoin (exempte d'HE). La CMI se définit comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Le résultat sera exprimé en % (v/v) ou en $\mu\text{L}/\text{mL}$.

A noter que les CMI ont été déterminées uniquement pour les souches ayant manifesté une grande sensibilité à l'action inhibitrice de l'HE par les méthodes préliminaires.

2.7. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique in vivo

2.7.1. Principe

L'activité anti-inflammatoire topique de l'HE a été évaluée *in vivo* sur des souris saines. L'œdème a été induit, au niveau de l'oreille droite de chaque souris, par application d'une solution irritante d'acétone contenant 1% d'huile de croton comme agent phlogogène. L'oreille gauche servait de témoin. La méthodologie suivie est celle décrite par Sosa *et al.* (2005) et Al-Reza *et al.* (2010).

2.7.2. Déroulement de l'essai

- Pour cela, 5 lots ont été constitués contenant chacun 6 souris. Ils ont été répartis comme suit :
- Lot 1 recevra une quantité de 2.5 $\mu\text{L}/\text{kg}$ d'HE par application cutanée sur l'oreille droite (OD), ce qui correspond à 10 μL d'HE par oreille.
 - Lot 2 recevra une quantité de 0.25 $\mu\text{L}/\text{kg}$ d'HE par application cutanée sur l'OD, ce qui correspond à 10 μL d'HE par oreille.
 - Lot 3 recevra une quantité de 0.05 $\mu\text{L}/\text{kg}$ d'HE par application cutanée sur l'OD, ce qui correspond à 10 μL d'HE par oreille.
 - Lot 4 (Témoin -) recevra 500 $\mu\text{L}/\text{kg}$ d'eau physiologique par application cutanée sur l'OD.
 - Lot 5 (Témoin +) recevra une quantité d'un gel anti-inflammatoire (Voltarène Emulgel[®] 1%, Diclofénac de sodium, Novartis, France) par application cutanée sur l'OD.

Ces différents traitements ont été appliqués une demi-heure avant l'induction de l'inflammation par une solution de 1% d'huile de croton. Après 24 heures, les souris ont été sacrifiées et des pièces circulaires, de 6 mm de diamètre, ont été coupées et retirées des oreilles traitées (droites) et non traitées (gauches). Ces pièces ont été pesées et conservées immédiatement dans du formol à 10% pour l'étude histopathologique.

L'activité anti-inflammatoire est exprimée par le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport au contrôle négatif, selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \left[\frac{(\Delta T -) - \Delta E}{(\Delta T -)} \right] \times 100$$

$\Delta T -$: Différence entre les moyennes du poids de l'oreille (gauche - droite) pour le lot Témoin - (eau physiologique 0.9% NaCl).

ΔE : Différence entre les moyennes du poids de l'oreille (gauche - droite) pour le lot essai (HE ou Témoin +).

2.7.3. Etude statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne du poids de l'oreille gauche (POG) \pm écart-type. La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par le test *post-hoc* de Tukey pour comparaison par paires. $P < 0.05$ a été considérée comme différence significative. L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica (version 8.0, Stat Soft Inc., 2007).

2.7.4. Etude anatomopathologique

Afin de confirmer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aromatique du thym commun au niveau cellulaire, des coupes anatomopathologiques ont été réalisées sur les pièces circulaires des oreilles droites et gauches coupées précédemment. La coloration effectuée était celle de Hématoxyline-Eosine selon la procédure de **Martoja *et al.*, (1967)** (voir **Annexe 3**).

Les coupes sont réalisées avec un microtome (Leica) permettant d'obtenir des sections de 3 à 5 μm d'épaisseur. L'observation a été accomplie par microscopie photonique (Leica) aux grossissements x5, x10 et x40. Des photos ont été prises pour quantifier l'intensité de l'inflammation (œdème) et l'infiltration cellulaire (recrutement des polynucléaires neutrophiles).

Étapes de la technique de coloration « Hématoxyline-Eosine »

1. Fixation :

- La fixation a pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du matériel dans le formol.

2. Déshydratation et Eclaircissement :

- La déshydratation a pour but de faire sortir l'eau contenue dans les tissus pour les préparer à l'inclusion. On utilise généralement un automate muni (Leica TP 1020) de plusieurs bacs contenant par ordre :

Réactifs	Temps (h)	Température (°C)
Formol	2	< 40
Ethanol 50%	2	45
Ethanol 50%	1	45
Ethanol 60%	1	45
Ethanol 70%	1	45
Ethanol 90%	1	45
Ethanol 98%	1	45
Xylène 50%	1	45
Xylène 60%	1	45
Paraffine 50%	2	60
Paraffine 60%	2	60

- L'inclusion dans la paraffine nécessite au préalable la déshydratation des pièces histologiques (bains successifs d'éthanol de degrés croissants, jusqu'à l'absolu).
- L'élimination complète des traces d'éthanol et l'imprégnation par le xylène.
- L'élimination de xylène et le remplacement par la paraffine. Les pièces sont placées successivement dans deux bains chacun, d'une durée de deux heures à une température de 60°C.

3. L'inclusion :

- L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes histologiques fines et régulières.
- Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Le paraplast (Leica Microsystems) est une paraffine synthétique qui imprègne bien les pièces.
- Régler la température du bain de paraffine en fonction de ce point de fusion (45-70°C).
- L'inclusion se fera dans des moules permettant les confections de blocs qui se montent sur le microtome.

4. Réalisation des coupes au microtome :

- Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées avec un microtome (Leica RM 212SRTS) permettant d'obtenir des sections de 3 à 5 µm d'épaisseur.
- Les rubans obtenus sont étalés sur les lames et mises à sécher 1h à 60°C.

5. Coloration :

Les différentes étapes de la coloration **Hématoxyline-Eosine** sont:

- Déparaffinage (Xylène).
- Hydratation (Ethanol).
- Coloration.
- Déshydratation (Ethanol).
- Eclaircissement (Xylène).

L'automate de coloration utilisé comprend les bacs suivants :

	Durée (minute)
Xylène	3
Alcool (éthanol 98%)	2
Eau distillé	2
Hématoxyline de Harris	6
Eau courante	3
HCl 1%	2 secondes
Alcool pur (éthanol 98%)	3
Eau lithiné	2
Eau courante	2
Eosine	12
Eau courante	3
Alcool (éthanol 98%)	2
Xylène	3

- Les coupes étant colorées, il faut les protéger contre la dégradation chimique des colorants qui s'oxydent facilement à l'air libre. Cette protection est assurée par une lamelle de verre qu'on colle sur la coupe à l'aide d'une substance appropriée (Eukitt) au colorant utilisé.
- L'observation et l'interprétation ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique (MO) à différents grossissement (G×5, G×10, et G×40).
- La prise des photos est réalisée par un appareil photo numérique.

3.1. Etude analytique de l'huile essentielle

3.1.1. Caractéristiques organoleptiques

Les paramètres organoleptiques de notre échantillon d'HE du *Thymus vulgaris* sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes **AFNOR (2000)** (**Tableau 3.1**).

Tableau 3.1. Propriétés organoleptiques de l'essence aromatique du thym commun (*T. vulgaris*).

Caractéristiques organoleptiques	Notre étude (2015)	AFNOR (2000)
Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile
Couleur	Brun clair	Couleur traditionnellement allant du brun au brun-rouge
Odeur	Caractéristique, camphrée, forte et légèrement épicée	Odeur caractéristique aromatique, phénolique avec un fond légèrement épicé

3.1.2. Détermination du profil chromatographique

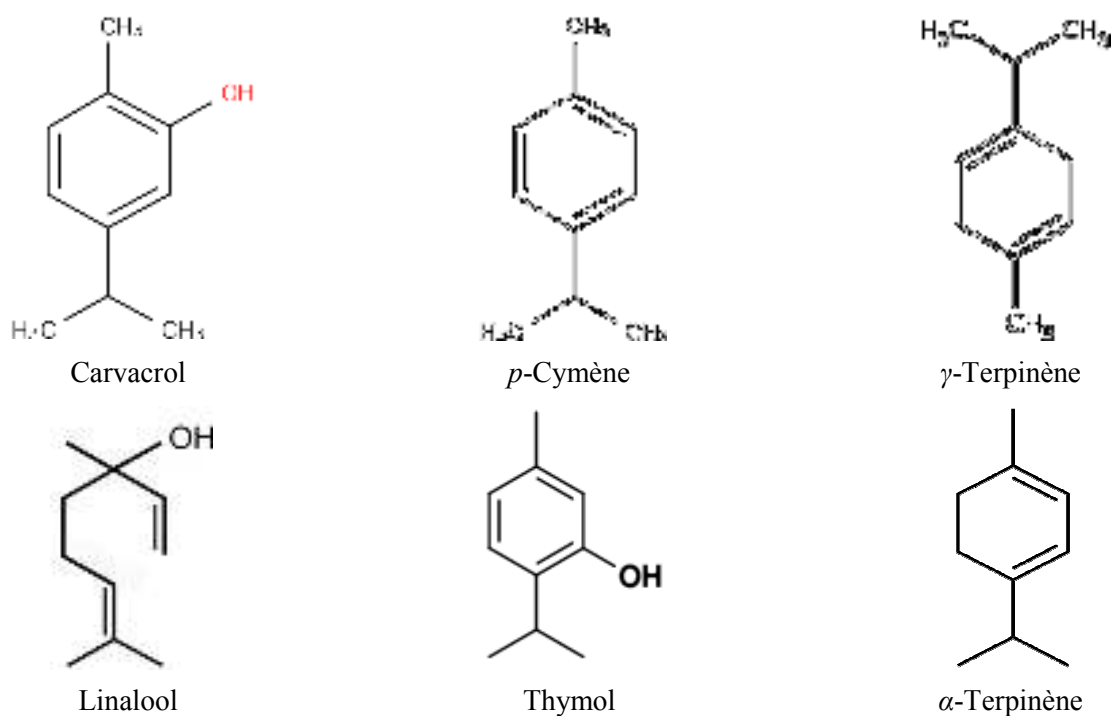
Les résultats de la composition chimique de l'HE de *Thymus vulgaris*, déterminée par CG-SM, sont rapportés dans le **Tableau 3.2** et la **Figure 3.2**. Les différents composés ont été listés selon leur Indices de Rétention (IR). Notre étude a été axée sur les composés volatiles majoritaires de l'HE tandis que les molécules, ayant des fragments de masse inférieure à 0.1%, n'ont pas été rapportées.

L'examen de ce tableau montre que le m'essence du thym commun étudié est composée majoritairement du carvacrol avec un taux de 83.8% (**Figure 3.1**). D'autre part, la teneur des autres composés varie entre (0.01 – 0.28%) sauf pour le *para*-cymène (8.15%), linalool (1.44%) et le *gamma*-terpinène (4.96%). De plus, la composition chimique, par famille, de l'HE du thym nous a révélé que cette HE est caractérisée par de très fortes teneurs en monoterpènes oxygénés (85%), suivi par les monoterpènes hydrocarbonés (13.5%). Cette présente de très faibles teneurs en sesquiterpènes hydrocarbonés (0.13%) et une absence de sesquiterpènes oxygénés.

Tableau 3.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* distillée, à échelle industrielle, par entraînement à la vapeur d'eau sous pression.

N°	Composés	EVE	IR
Monoterpènes hydrocarbonés		13,5	
1	α -Terpinène	0,28	1019
2	<i>p</i> -Cymène	8,15	1028
3	<i>trans</i> -Ocimène	0,11	1052
4	γ -Terpinène	4,96	1065
Monoterpènes Oxygénés		85,52	
5	Linalool	1,44	1123
6	Terpin-4-ol	0,05	1179
7	Thymol	0,23	1302
8	Carvacrol	83,8	1318
Sesquiterpènes hydrocarbonés		0,13	
9	Aromadendrène	0,06	1439
10	α -Humulène	0,03	1454
11	γ -Cadinène	0,01	1513
12	δ -Cadinène	0,03	1542
Autres composés oxygénés		0,19	
13	Carvacrol méthyle éther	0,19	1282
Composés Oxygénés totaux		85,71	
Composés non Oxygénés totaux		13,63	

EVE : Entraînement à la Vapeur d'Eau ; IR : Indice de Rétention sur colonne apolaire (HP-5MS).

**Figure 3.1.** Structure chimique de quelques composés détectés dans l'essence aromatique de *Thymus vulgaris*

Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par plusieurs auteurs (**Fachini-Queiroz et al., 2012 ; Abedini et al., 2014 ; Oliva et al., 2015**). Une étude récente, publiée par une équipe Iranienne (**Abedini et al., 2014**) dans la revue « Journal of Essential Oil Bearing Plants », a révélé que le carvacrol était le composé majoritaire de l'essence distillée de la partie aérienne fraîche de *T. vulgaris* avec un taux de 57.3%, suivi par le linalool (11.8%) et le thymol (10.7%). Un autre travail, publié par une équipe Egyptienne (**El-Nekeety et al., 2011**) dans la revue « Toxicon », a révélé aussi la prédominance du carvacrol dans l'essence de *T. vulgaris* avec un taux de 45%. Dans le même sillage, l'essence distillée de *T. vulgaris* cultivé en Argentine a été aussi caractérisée par la prédominance de carvacrol avec un taux avoisinant les 30% et une faible quantité de thymol (1.5%) (**Oliva et al., 2015**), ce qui est en totale adéquation avec nos résultats.

En revanche, d'autres équipes ont rapportés des résultats complètement différents aux nôtres où la principale caractéristique de l'HE de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée en thymol (**Perina et al., 2014 ; Zeljković et al., 2015 ; Nabavi et al., 2015**). D'après **Pavela et al. (2009)**, les analyses ont montré que les substances majoritaires pour *T. vulgaris* étaient le thymol (60.3%) et le *p*-cymène (10.1%). Les hydrocarbures sesquitépéniques ne représentent qu'un faible pourcentage (1.7%). **Pino et al. (1997)** ont rapporté avoir extrait un échantillon caractérisé par un fort taux de thymol (34.6 %), γ -terpinène (17.6 %) et *p*-cymène (17.6 %). En revanche, ils diffèrent de ceux publiés par **Naguib (2002)**, dont l'essence se caractérise plutôt par une forte teneur en thymol (36.6 %), α - thujone (23.2 %) et 1,8-cinéole (13.4 %). **Porte et Godoy (2008)** ont signalé également que le thymol (44.77%), *p*-cymène (18.6%) et γ -terpinène (16.5%) sont des substances majoritaires de *Thymus vulgaris* cultivé au Rio de Janeiro (Brésil). Par ailleurs, une équipe Polonaise (**Szczepanik et al., 2012**) a établi la prédominance du thymol dans l'essence de thym commun avec un taux de 57%, alors que le carvacrol a été retrouvé minoritaire (2%), ce qui semble être en totale discordance avec nos résultats.

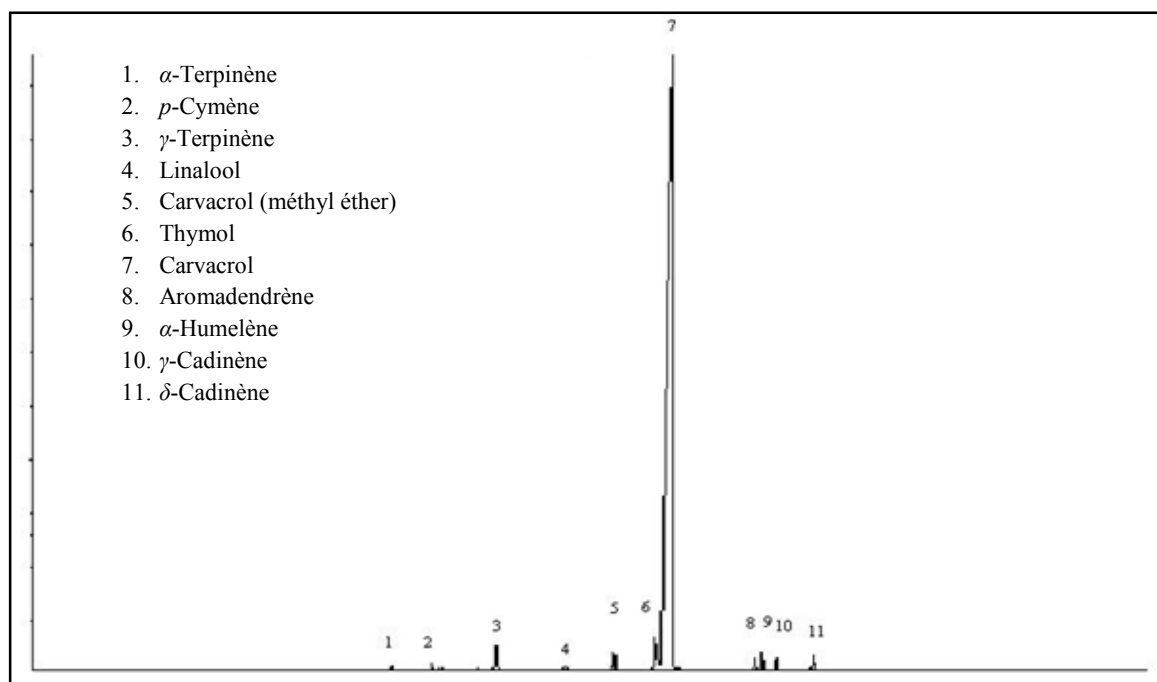


Figure 3.2. Chromatogramme de l'essence du *T. vulgaris* distillée par entraînement (**Originale, 2015**).

La variabilité chimique des HE des espèces du genre *Thymus* dépend de plusieurs facteurs, qui généralement sont d'ordre climatique et environnemental (**Tableau 3.3**), mais ils peuvent être aussi d'ordre génétique, saisonnier (stade végétatif) ou industriel (méthodologie d'extraction).

Tableau 3.3. Principaux composés décelés dans l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* provenant de différents écosystèmes.

Auteurs (année)	Pays	Principaux composés (majoritaire et caractéristique)
Pina-Vaz et al. (2004)	Portugal	▪ carvacrol (70.3%), <i>p</i> -cymène (11.7%), γ -Terpinène (3.2%), linalool (2.2%), thymol (0.6%)
Sacchetti et al. (2005)	Italie	▪ <i>p</i> -cymène (15.3%), géraniol (8%), thujone (7.3%), γ -terpinène (5.6%)
Klarić et al. (2007)	Croatie	▪ <i>p</i> -cymène (36.5%), thymol (33%), 1,8-cinéole (11.3%), α -terpinéol (4.8%), carvacrol (4%), bornéol (2%), linalool (2%)
Yahyazadeh et al. (2008)	Iran	▪ thymol (46%), <i>p</i> -cymène (17.6%), γ -terpinène (14.8%)
Soković et al. (2009)	Serbie	▪ thymol (48.9%), <i>p</i> -cymène (19%), γ -Terpinène (4.1%), carvacrol (3.5%)
Imelouane et al. (2009)	Maroc	▪ camphre (39.39%), camphène (17.57%), α -pinène (9.55%), 1,8-cinéole (5.57%), bornéol (5.03%), β -pinène (4.32%)
Kloucek et al. (2011)	République de Tchèque	▪ thymol (42.5%), <i>p</i> -cymène (29.5%) ▪ linalool (58%), thymol (15.2%)
Miladi et al. (2013)	Tunisie	▪ thymol (41.33%), <i>p</i> -cymène (18.08%), and γ -terpinene (13.12%)
Abedini et al. (2014)	Iran	▪ carvacrol (57.3 %), linalool (11.8 %), thymol (10.67 %).
Sidali et al. (2014)	Algérie	▪ carvacrol (55.2%), γ -terpinene (12.6%), <i>p</i> -cymène (9.3%), linalool (3.9%), α -terpinene (2.8%)
Mancini et al. (2015)	Italie	▪ thymol (46.2%–67.5%), carvacrol (5.7%–7.3%), oxyde de caryophyllène (1.7%–7.3%)
Kazemi (2015)	Iran	▪ 1,8-cinéole (6.23 %), camphre (15.14 %), α -pinène (8%), camphène (10.5%), carvacrol (18.5%), thymol (20.35%)
Grespan et al. (2015)	Brésil	▪ carvacrol (45.5%), α -terpineol (22.9%), endo-borneol (14.3%)
Rus et al. (2015)	Roumanie	▪ <i>p</i> -cymène (32.9%), carvacrol (20%), γ -terpinène (14.3%), thymol (3.3%)
Kohiyama et al. (2015)	Brésil	▪ bornéol (40.6), camphene (12.3), carvacrol (6.4), α -pinène (6.1)
De Carvalho et al. (2015)	Brésil	▪ thymol (43.2%), <i>p</i> -cymène (28.5%), γ -terpinène (6.36%), linalool (5.57%), carvacrol (3.14%).
Guerra-Boone et al. (2015)	Mexique	▪ <i>p</i> -cymène (37%), γ -terpinène (20%), thymol (17%), carvacrol (4.9%)
Varga et al. (2015)	Roumanie	▪ thymol (32.2%), <i>p</i> -cymène (21.7%), γ -terpinène (13%), carvacrol (5.1%), linalool (3.4%)
Deletre et al. (2015)	France	▪ thymol (30.5%), <i>p</i> -cymène (23.7%), carvacrol (13.6%), α -terpinène (8.4%), linalool (4%)

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *Thymus vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). L'hybridation facile de l'espèce mène à une grande variabilité intra-spécifique, qui affecte l'homogénéité du rendement d'extrait et sa composition en produits chimique (Al-Tawaha *et al.*, 2014 ; Nabavi *et al.*, 2015)

3.2. Résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle *in vitro*

L'activité antimycosique de l'essence aromatique du *Thymus vulgaris*, effectuée par 2 méthodes différentes et complémentaires (aromatogramme et microatmosphère), a été testée sur des souches levuriformes et mycéliennes isolées cliniquement. Au total, neuf souches de levure et sept champignons filamenteux ont été utilisés lors ce test. Les résultats de ce screening antifongique sont consignés dans le **Tableau 3.4**. A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul du Diamètre de la Zone d'Inhibition (DZI, mm). Pour ce test, des quantités croissantes en HE ont été utilisées pour apprécier l'action « Dose-Dépendante » de l'essence du thym commun.

Tableau 3.4. Activité antifongique *in vitro* de l'essence aromatique de *Thymus vulgaris*.

	Méthodes utilisées						
	Aromatogramme (DZI, mm)			Microatmosphère (DZI, mm)			HEX
	Quantité Huile essentielle (mg/disque)						
	20	40	60	20	40	60	40
Souches levuriformes							
<i>Candida albicans</i>	59.66	69.66	85	60.66	85	85	15
<i>Candida tropicalis</i> (Ct 1)	60.66	79.66	85	55	74.33	85	25
<i>Candida tropicalis</i> (Ct 2)	60	78	85	71	85	85	-
<i>Candida tropicalis</i> (Ct 3)	80	85	85	85	85	85	-
<i>Candida parapsilosis</i> (Cp1)	54	74.33	85	59.66	80	85	30
<i>Candida parapsilosis</i> (Cp 2)	85	85	85	85	85	85	20
<i>Trichosporon</i> sp.	60.33	72.66	85	60.33	75.33	85	30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53	75	85	69	80	85	10
<i>Rhodotorula</i> sp.	85	85	85	85	85	85	30
Souches mycéliennes							
<i>Aspergillus niger</i>	69.66	80	85	70.33	85	85	-
<i>Aspergillus flavus</i> (Af 1)	75	80	85	64.33	75.33	85	10
<i>Aspergillus flavus</i> (Af 2)	70	80	85	60	80	85	13
<i>Aspergillus fumigatus</i>	51	65.33	85	56.66	74.33	85	13
<i>Rhizopus</i> sp.	51	63	85	35	79	85	-
<i>Fusarium</i> sp.	40	51	55	52	60	79	10
<i>Penicillium</i> sp.	85	85	85	50	64	85	20

(-) Aucune zone d'inhibition ; DZI : Diamètre de la Zone d'Inhibition (moyenne des répétitions) (diamètre du disque 9 mm a été inclus) ; HE : Huile Essentielle ; HEX : solution antiseptique d'Hexomédine (0.1%) (Biopharm, Alger).

3.2.1. Résultats de l'aromatogramme

L'HE du thym commun a présenté, *in vitro*, une bonne activité inhibitrice sur la croissance de toutes les souches fongiques (levures et moisissures) testées. En phase liquide, l'essence du thym a exhibé (**Figure 3.3**) une activité antifongique importante notamment sur les levures où les DZI obtenus oscillent entre 53 et 85 mm pour les disques imprégnés de 20 mg d'HE et entre 69 et 85 mm avec les disques imprégnés de 40 mg d'HE. Une inhibition totale de la croissance de ces champignons unicellulaires a été notée pour la quantité d'HE de 60 mg/disque. *Candida tropicalis* et *C. parapsilosis* (Cp 2) demeurent les espèces les plus sensibles avec une inhibition totale (85 mm) à la plus faible dose en HE.

Concernant les champignons filamenteux pluricellulaires, les mêmes constatations ont été signalées où les DZI enregistrés s'échelonnent entre 40 et 85 mm pour la plus faible dose. De plus, une inhibition totale a été constatée pour la dose la plus élevée. Par ailleurs, l'espèce du genre *Penicillium* est la plus sensible à l'action inhibitrice de la phase liquide avec une inhibition totale (85mm) à la plus faible quantité en HE. En outre, l'essence du thym commun a exhibé une action antifongique « dose-dépendante » sur la totalité des souches fongiques, uni ou pluricellulaires.

Par ailleurs, une étude comparative a été faite avec le contrôle positif, en l'occurrence une solution antiseptique d'Hexomedine. Eu égard des résultats obtenus, il en ressort que notre échantillon d'HE de thym est doué d'un fort pouvoir antimycosique, largement supérieur à celui du témoin positif où les DZI obtenus ne dépassent pas, dans les meilleurs des cas, la valeur de 30 mm (*Candida parapsilosis* et *Rhodotorula* sp.).

Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité antifongique des métabolites terpéniques des espèces du genre *Thymus*. Nos résultats sont en concordance avec ceux de plusieurs travaux antérieurs (**Giordani et al., 2004 ; Pinto et al., 2006 ; Pekmezovic et al., 2015 ; Kohiyama et al., 2015**). Des résultats similaires aux nôtres ont été aussi rapportés par l'équipe française de **Giordani et al. (2008)**. Ces derniers ont étudié l'activité antifongique de 2 espèces du genre *Thymus*. Ils ont rapporté un fort pouvoir antifongique de l'HE distillée du *Thymus vulgaris* bien que sa teneur en phénols (thymol et carvacrol) (36.7%) soit inférieure à celle de *Thymus numidicus* (65.87%). Ils ont conclu que d'autres constituants pourraient intervenir dans le pouvoir antifongique de l'HE.

Les résultats obtenus par une équipe Belge (**Manou et al., 1998**) ont suggéré les potentielles applications de l'essence aromatique de *T. vulgaris* comme conservateur antifongique dans des préparations galéniques dermo-cosmétiques à visée thérapeutique. En effet, il a été observé que les crèmes dermiques, contenant l'essence du thym comme conservateur, ont présenté une bonne stabilité microbiologique dans le temps et une bonne protection contre les contaminations fongiques liées à *Candida albicans* (**Manou et al., 1998**).

Dans notre étude, la composition chimique de l'HE utilisée est dominée par la présence des molécules oxygénées (85.5%). Le principal constituant, le carvacrol, représente à lui seul plus des 3/4 de la quantité totale. Il appartient à la classe des phénols. Une revue de littérature (**Hyldgaard et al., 2012**) fait apparaître que les essences aromatiques riches en composés oxygénés sont dotées d'un fort pouvoir antimicrobien. Les phénols sont d'ailleurs reconnus pour exercer un effet plutôt fongicide (**Chavan et Tupe, 2014 ; Chaillot et al., 2015 ; Cacciatore et al., 2015**).

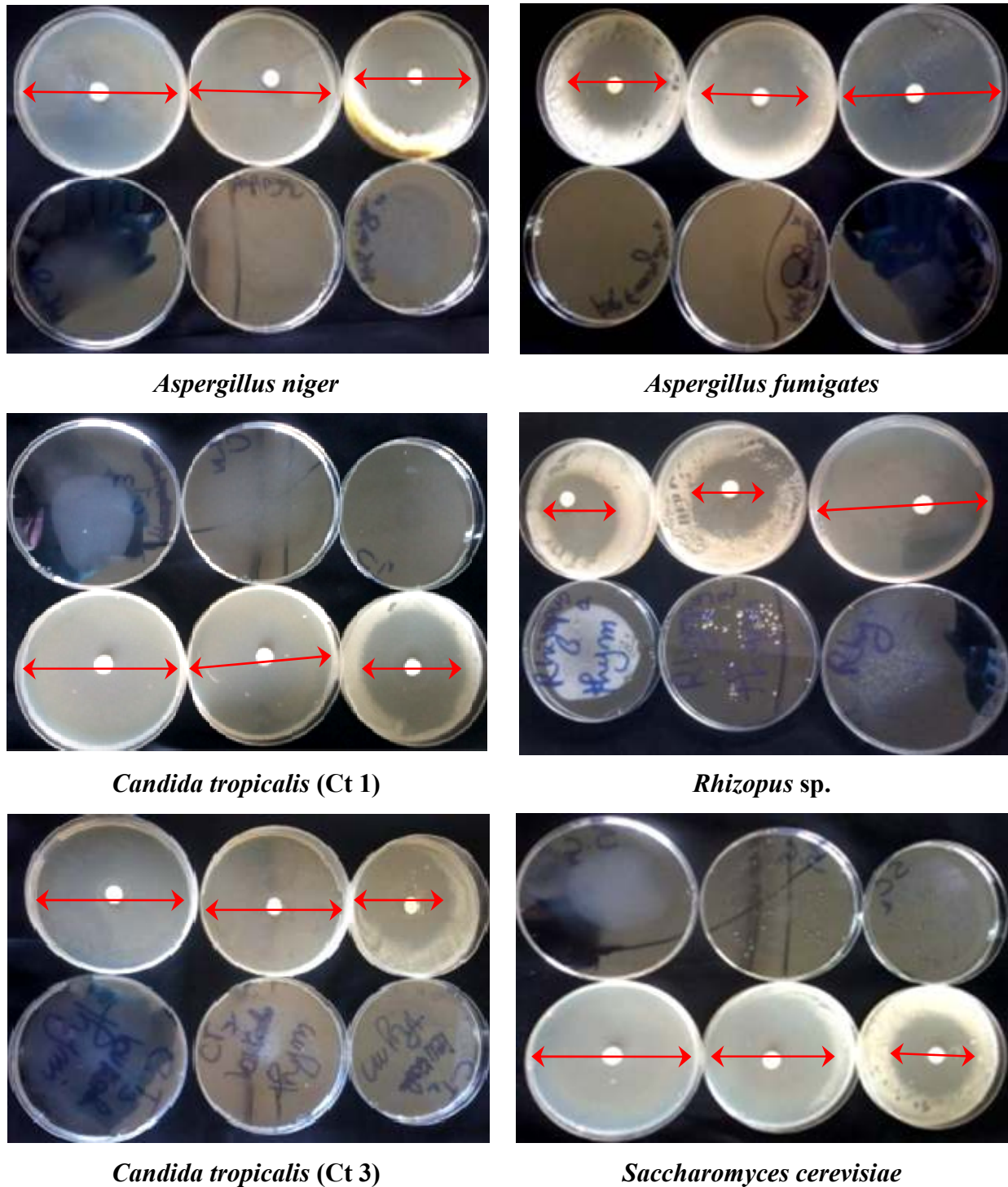


Figure 3.3. Aromatogramme de l'essence aromatique du thym commun sur certaines souches fongiques. (**Originale, 2015**)

La plupart des composés chimiques des HE sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antifongiques les plus importantes, et en particulier les phénols (carvacrol, thymol et eugénol) ainsi que les alcools (linalool) (**Kuorwel et al., 2014 ; Nabavi et al., 2015**). **Bagamboula et al. (2004)** ont montré que la nature antimicrobienne des HE est en rapport avec leur fort contenu phénolique, en particulier en thymol et carvacrol. Ils ont prouvé que plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles aromatiques sont efficaces. Ceci a été confirmé par l'étude menée par **Pinto et al. (2006)** qui ont signalé que les espèces du genre *Thymus*, contenant une quantité importante en phénols, présentent un large spectre d'activité sur les champignons filamenteux.

Le mécanisme d'action des extraits aromatiques sur les souches fongiques n'a pas été totalement élucidé. Cependant, certaines études soulignent que l'action antifongique de ces huiles terpéniques est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci, entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et par conséquent la mort cellulaire. La lyse des cellules de levure a été montrée par la libération de substances absorbant à 260 nm (**Burt, 2004 ; Chami et al., 2005**).

Le mode d'action antimycosique de certaines molécules terpéniques a été décrit dans la littérature. Le carvacrol et le thymol semblent capables d'augmenter la perméabilité membranaire (**Lambert et al., 2001**). En détruisant la membrane externe des germes pathogènes, ils augmenteraient la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (**Helander et al., 1998**). Ainsi, le carvacrol, en augmentant la perméabilité de la membrane plasmique, n'entraîne pas une fuite d'ATP mais une fuite de protons, qui provoque la chute de la force protomotrice et, donc, de la synthèse d'ATP. Cette information est confirmée par la mesure du gradient de pH à travers la membrane plasmique. Le carvacrol formerait des canaux dans la membrane permettant la fuite des ions (**Ultee et al., 2002**). En plus de limiter la croissance, le carvacrol est capable d'inhiber la production de toxines microbiennes. Deux hypothèses ont été présentées : soit l'exportation active des toxines hors de la cellule n'est plus possible à cause du manque d'ATP ou de la diminution de la force protomotrice, soit le faible taux d'ATP restant dans la cellule est utilisé par le germe pour survivre (**Ultee et Smid, 2001**).

Le carvacrol possède aussi un large spectre d'activité, étendu aux germes d'altération alimentaire ou des champignons pathogènes, des levures et des microorganismes pathogènes humains, animaux et végétaux, des biofilms y compris lors de résistance aux antibiotiques. Cette activité a été attribuée à ses effets considérables sur les propriétés structurales et fonctionnelles de la membrane cytoplasmique (**Iannitelli et al., 2011 ; Nostro et Papalia, 2011**). En outre, l'activité antifongique des HE pourrait également être liée à l'interférence des composants de l'essence dans des réactions enzymatiques de la synthèse de la paroi cellulaire, ce qui affecte la croissance fongique (**Carmo et al., 2008**). **Chalchat et al. (1997)** ont signalé que les huiles aromatiques endommagent une série de systèmes enzymatiques des moisissures, affectant, de ce fait, la synthèse et la production énergétique des composantes structurales.

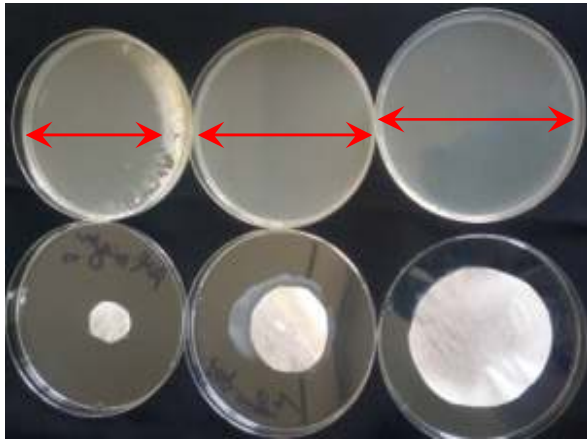
Plusieurs auteurs, notamment **De Billerbeck *et al.* (2001)**, **Mares *et al.* (2004)**, **Rasooli et Abyaneh (2004)** et **Sharma et Tripath (2007)**, ont constaté que les HE peuvent causer des changements morphologiques comprenant l'insuffisance de sporulation, la perte de pigmentation, le développement anormal des conidiophores et la déformation des hyphes.

D'une manière générale, certains auteurs s'accordent, à l'heure actuelle, pour affirmer que les propriétés antiseptiques de l'essence végétale sont dues à la présence d'une grande proportion de molécules (carvacrol) reconnues pour avoir une activité antiseptique propres comme les phénols. Or vouloir relier directement les vertus thérapeutiques d'une HE à la seule présence des composés majoritaires est illusoire. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de façon synergique. De cette manière, la valeur d'une huile tiennent à son « Totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants. Il se dégage, de ces études, que le phénomène « synergie-inhibition » prend ici toute sa valeur démonstrative (**Salle, 1991 ; Hyldgaard *et al.*, 2012**).

In vivo, l'incidence croissante des infections fongiques, plus particulièrement celles provoquées par les levures du genre *Candida*, pousse à rechercher de nouveaux agents antifongiques qui ne soient pas fongistatiques, toxiques et générateurs de résistance comme ceux déjà utilisés (**Abyaneh et Rai, 2013**). La recherche d'une alternative thérapeutique s'avère donc nécessaire. D'où l'intérêt d'essayer de transposer les résultats de l'action anti-candidosique de l'essence du thym commun, obtenus *in vitro*, sur des modèles *in vivo*. Ces dernières années, la communauté scientifique a montré un intérêt considérable dans l'étude de nouveaux antimicrobiens végétaux. Dans ce contexte, les substances terpéniques du thym commun semblent être, comme le confirme nos résultats ainsi que la pratique quotidienne en aromathérapie, les molécules phares de la lutte antimicrobienne et leur cible privilégiée des champignons aussi variées.

3.2.2. Résultats de la microatmosphère

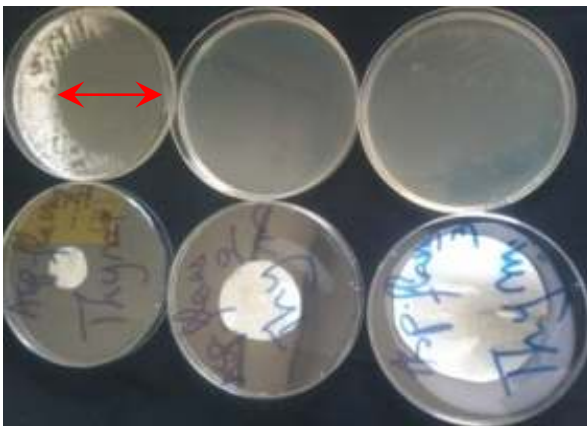
Un screening antifongique de l'essence aromatique du thym commun a été réalisé en microatmosphère pour apprécier l'efficacité inhibitrice de l'essence en phase vapeur. Les résultats de ce screening sont colligés dans le **Tableau 3.3**. En concordance avec les résultats obtenus en aromatogramme, la phase vapeur de l'essence a exhibé une action inhibitrice sur la croissance de tous les champignons unicellulaires (levures) où les DZI obtenus varient entre 55 et 85 mm à la plus faible quantité en HE. De plus, une action fongicide a été notée sur la croissance de *Candida parapsilosis* (Cp 2) et *Rhodotorula* sp. à la plus faible dose. En outre, cette action létale a été confirmée sur toutes les souches levuriformes à la dose la plus élevée. Concernant les moisissures, des résultats intéressants ont été obtenus notamment pour les espèces du genre *Aspergillus* avec des DZI oscillant entre 56 et 70 mm pour la plus faible dose. Une action antifongique « dose-dépendante » (**Figure 3.4**) a été aussi notée pour tous les isolats mycéliens. La phase vapeur de l'huile s'est révélée fongicide sur toutes les souches mycéliennes exceptées le *Fusarium* sp. Les résultats obtenus *in vitro* sont très encourageants pour une éventuelle application *in vivo* ou encore comme principe actif.



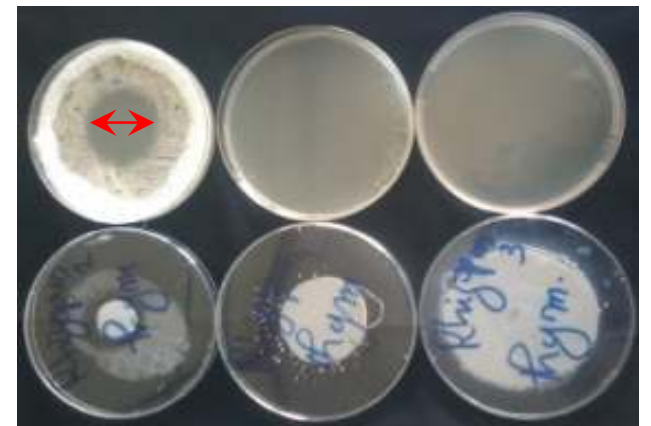
Aspergillus niger



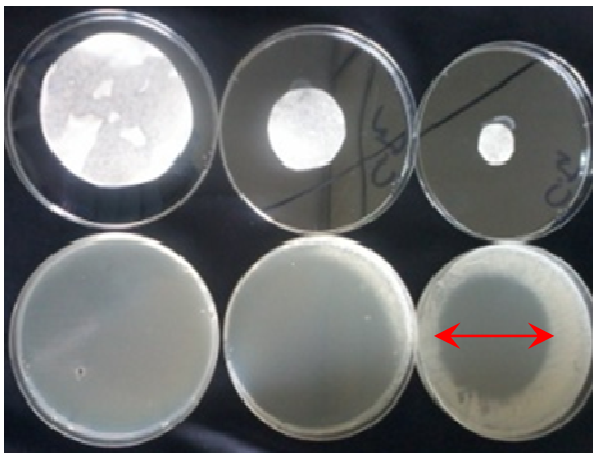
Aspergillus flavus (Af 1)



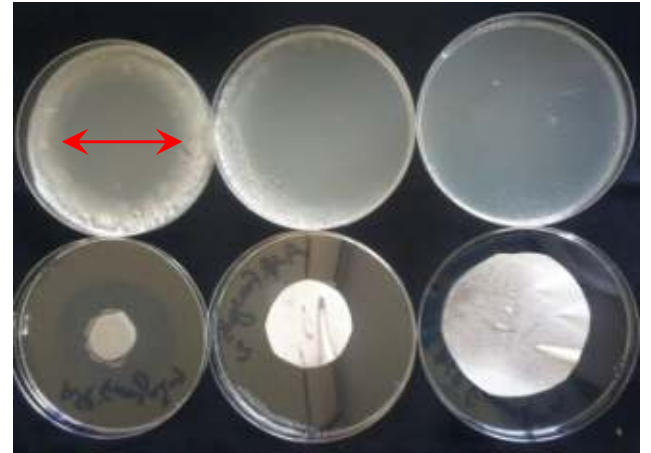
Aspergillus flavus (Af 2)



Rhizopus sp.



Candida tropicalis (Ct 1)



Aspergillus fumigatus

Figure 3.4. Pouvoir antifongique de la phase vapeur de l'essence aromatique du thym commun (*Thymus vulgaris*) sur certaines souches fongiques. (Originale, 2015)

Le pouvoir antimicrobien de la phase gazeuse des huiles aromatiques et des molécules terpéniques n'est pas surprenant du moment que plusieurs travaux ont été publiés dans ce sens mais la littérature scientifique reste peu prolixe (Tyagi et Malik, 2011 ; Laird et Phillips, 2012). A l'heure actuelle, nous pouvons affirmer, sans conteste, qu'il existe des centaines de publications et autres travaux publiés mettant en exergue le potentiel antifongique des extraits végétaux en phase liquide (Tableau 3.6). Cependant, ce nombre ne dépasse pas, au mieux, une vingtaine d'articles de recherche ou revues de synthèse qui mettent en évidence l'effet fongistatique de ces produits volatils en microatmosphère.

Pour ce qui de l'action antifongique de la phase vapeur des HE en générale, et celle de thym en particulier, très peu d'études ont été réalisées à ce jour (Klarić *et al.*, 2007). Une revue de littérature fait apparaître que la majorité des travaux menés sur l'action inhibitrice de la phase vapeur de l'essence de thym concerne les bactéries ou encore les champignons phytopathogènes. Notre travail reste, à ce jour, le premier à mettre en exergue le pouvoir anti-candidosique de la phase vapeur de l'essence de *T. vulgaris* sur des levures impliquées dans les infections humaines.

Un travail similaire au notre a été mené par un équipe Tchèque (Klarić *et al.*, 2007). Les résultats de cette étude ont révélé l'efficacité de la phase vapeur du thym, à la concentration de 82 µg/l, dans l'inhibition de la croissance mycélienne de plusieurs souches aspergillaires (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. sulphureus* et *A. versicolor*), pénicillaires (*Penicillium chrysogenum*, *P. brevicompactum* et *P. griseofulvum*), mucorales (*Mucor* spp.), *Trichoderma* spp. et *Rhizopus* spp..

Une étude Japonaise (Inouye *et al.*, 2001), publiée dans la revue « Mycose », a mis en exergue l'aptitude des huiles aromatiques du thym et de citronnelle dans la réduction, d'une façon significative, de la croissance mycélienne d'un dermatophyte pathogène (*Trichophyton rubrum*). Les auteurs de cette même étude ont démontré que le mode d'action de la vapeur réside dans la déformation morphologique et la rupture de la membrane cellulaire. Par conséquent, ces altérations réduisent l'aptitude d'adhérence des cellules et donc la réduction de leur virulence.

Une investigation profonde et récente a été menée par une équipe Tchèque (Kloucek *et al.*, 2011) concernant l'efficacité de la phase vapeur de 69 HE sur la croissance de certaines souches bactérienne et fongique impliquées dans l'altération des denrées alimentaires. Eu égard des résultats obtenus, l'HE de *T. vulgaris* a été référencée parmi les huiles qui ont un puissant effet antifongique vis-à-vis des champignons filamenteux tels que *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* et *Penicillium digitatum*. De plus, l'essence du thym commun a été caractérisée par la prédominances des composés phénoliques. Les résultats de ce travail très intéressant ont été publiés dans la revue « Food Research International ». Toujours dans le même sillage, l'étude menée par Neri *et al.* (2006), sur le pouvoir inhibiteur des composés terpénique isolés, a révélé que le carvacrol était le composé le plus efficace dans l'inhibition de la croissance mycélienne d'un champignon phytopathogène, le *Penicillium expansum*. Cette constatation a été même confirmée par un essai de « biocontrôle » sur les fruits (poires). Ce composé (carvacrol) a été retrouvé aussi majoritaire (83%) dans notre échantillon d'HE, ce qui laisse suggérer sa grande contribution dans l'inhibition des souches fongiques.

Dans le domaine de la protection post-récolte des denrées alimentaires, l'étude menée par **Yahyazadeh et al. (2008)** a confirmé le potentiel inhibiteur de la phase vapeur du thym vis-à-vis d'un champignon phytopathogène (*Penicillium digitatum*). De plus, cette essence est douée d'un pouvoir fongicide, confirmé par les altérations structurales observées au niveau des cellules fongiques par microscope à balayage électronique.

En conclusion, les résultats que nous avons obtenus sont très prometteurs pour une éventuelle utilisation de la fraction aromatique du thym comme principe actif, dans des préparations galéniques à visée thérapeutique pour lutter contre les infections fongiques. En général, une substance peut être considérée comme un bon agent antimicrobien *in vivo* lorsqu'elle agit à de faibles concentrations *in vitro* car il y a un risque de confrontation aux problèmes de toxicité *in vivo*. Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* sont très encourageants pour une éventuelle application *in vivo*. En thérapie, l'essence du thym commun pourra trouver une place comme désinfectant atmosphérique en milieu hospitalier afin de lutter contre les contaminations fongiques aéroportées, ainsi que pour le contrôle de l'hygiène de l'air, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air.

3.2.3. Etude comparative : Aromatogramme versus Microatmosphère

A la lecture comparative des résultats obtenus entre les deux méthodes (aromatogramme et microatmosphère), il apparaît clairement qu'aucune différence notable de l'efficacité antifongique entre les deux méthodes ne peut être dégagée. Les deux phases, liquide et vapeur, sont douées d'un fort pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne, notamment au dosage le plus élevé où toutes les souches ont été inhibées totalement (85 mm), excepté le *Fusarium* sp.. Par ailleurs et avec les souches levuriformes, d'action inhibitrice de la phase vapeur paraît légèrement supérieure comparativement à l'aromatogramme, en particulier pour le dosage le plus faible. Dans tous les cas, le pouvoir antimycosique de l'essence du thym paraît très puissant et supérieur à celui du contrôle positif (Hexomedine, 0.1%).

Concernant le screening antimycosique par la méthode de microatmosphère, il a été constaté, qu'avec certains germes, la phase volatile de l'HE est plus active que la phase liquide (**Figure 3.5**). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en contact direct, les HE diffusent mal en milieu gélosé à cause de leur non miscibilité et, par conséquent, un contact réduit entre le germe et l'HE. Par contre et en microatmosphère, l'HE est très volatile et, de ce fait, il y aura une bonne diffusion sur une gélose ensemencée préalablement (**Laird et Phillips, 2012**).

A la lecture de la littérature scientifique, il en ressort que la microatmosphère est très peu documentée. En effet, rares sont les articles qui traitent de cette méthode. Les études réalisées par **Tyagi et Malik (2011)** ont mis en exergue que la phase vapeur de l'essence d'*Eucalyptus globulus* était plus inhibitrice sur la croissance des germes que la phase liquide.

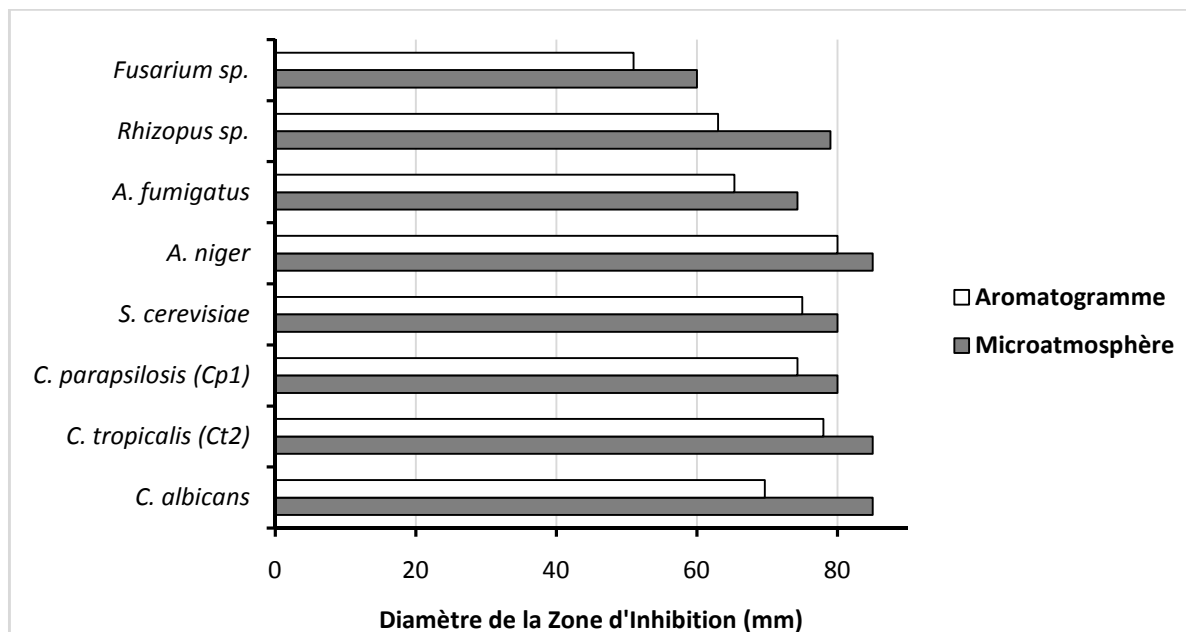


Figure 3.5. Etude comparative : Aromatogramme vs Microatmosphère

En résumé et eu égard des résultats obtenus, aucun consensus ne peut être dégagé quant à la méthode la plus idéale à mettre en exergue le pouvoir antimycosique des mélanges terpéniques des PAM. Cette activité pourrait être due à l'effet combinatoire de ses phases vapeur et liquide.

3.2.4. Détermination des Concentration Minimales Inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI a été accomplie uniquement pour les germes fongiques ayant montré une grande sensibilité vis-à-vis de l'action inhibitrice de l'HE. Du fait de la non miscibilité des HE dans la gélose, l'incorporation d'un dispersant (DMSO) a été nécessaire pour une bonne diffusion à travers le milieu gélosé. Par ailleurs, la gamme de dilutions en HE utilisée, lors de cette étude, varient entre 10 à 0.001 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Les résultats de cette analyse sont colligés dans le **Tableau 3.5**. En revanche, les moisissures, bien qu'elles soient sensibles, n'ont pas été étudiées ; elles nécessitent une approche méthodologique totalement différente du fait de leur croissance lente et de la nature de la colonie (tapis mycélien fortement fixé au milieu gélosé).

Tableau 3.5. Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI, $\mu\text{L}/\text{mL}$) des champignons unicellulaires déterminées par dilution en milieu gélosé.

Souches levuriformes	CMI ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
<i>Candida albicans</i>	0.3
<i>Candida parapsilosis</i>	0.3
<i>Candida parapsilosis</i>	0.3
<i>Candida tropicalis</i>	0.3
<i>Candida tropicalis</i>	0.3
<i>Candida tropicalis</i>	0.3
<i>Trichosporon sp.</i>	0.3
<i>Rhodotorula sp.</i>	0.15

Toutes les levures testées sont très sensibles à l'action inhibitrice de l'HE du thym, avec des valeurs de CMI de l'ordre de 0.3 µL/mL, excepté *Rhodotorula* sp. qui a présenté une CMI de 0.15 µL/mL. Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par d'autres travaux antérieurs (**Pina-Vaz et al. (2004)**). Cependant, il est difficile, voire problématique, de faire des comparaisons entre les valeurs des CMI de différentes études (**Tableau 3.6**). Beaucoup des HE ont la réputation d'être des anti-infectieux efficaces, néanmoins les résultats actuellement publiés sont controversés. Les deux raisons principales sont d'une part la très grande variabilité de la composition chimique des essences du genre *Thymus* et, d'autre part, le manque de fiabilité des méthodes microbiologiques appliquées aux produits insolubles (**Hyldgaard, 2012**).

Tableau 3.6. Etude comparative entre les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des levures soumis au pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

Auteurs (année)	Sacchetti <i>et al.</i> (2003)	Pina-Vaz <i>et al.</i> (2004)	Pozzatti <i>et al.</i> (2008)	Pinto <i>et al.</i> (2013)	Khan <i>et al.</i> (2014)
Unité de CMI	mg/mL	µL/mL	mg/mL	µL/mL	mg/mL
<i>Candida albicans</i> ATCC	0.06	0.16–0.32	800–3200	0.64	90-360
<i>C. albicans</i>	-	0.16	800–1600	0.32-0.64	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC	-	0.16–0.32		0.32-0.64	-
<i>C. tropicalis</i>	-	0.16–0.32	800–1600	0.32	90
<i>C. glabrata</i>	-	0.32	800–1600	0.32-0.64	90-180
<i>C. krusei</i>	-	0.16	1600–3200	0.64	180
<i>C. guilliermondii</i>	-	0.16	-	0.32	-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	-	0.16–0.32	-	0.64	-
<i>C. dubliniensis</i>	-	-	400–1600	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0.06	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.06	-	-	-	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	0.03	-	-	-	-

(-) non déterminé ; ATCC : American Type Culture Collection ; CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

Une équipe Française (**Giordani et al., 2004**) reste, sans conteste, celle qui a le plus travaillé pour valoriser le pouvoir antifongique des extraits aromatiques du thym commun en aromathérapie anti-infectieuse. A défaut d'antifongiques nouveaux et plus puissants, des travaux ont permis de favoriser l'action antifongique de molécules comme l'Amphotéricine B de telle façon que la quantité nécessaire soit inférieure et permette alors d'espérer une diminution des effets secondaires indésirables. Ainsi, **Giordani et al. (2004)** ont montré que l'utilisation des HE de *T. vulgaris*, en concomitance avec les antifongiques de synthèse (Amphotéricine B), pourrait induire une diminution (80% de la CMI initiale) de la quantité de cet antifongique nécessaire à une inhibition de la croissance fongique. Expérimentalement, les HE du thym et de ses hybrides ont fait preuve de leur efficacité antifongique, parfois même supérieure à celle des antifongiques commerciaux (**Hussain et al., 2011 ; Pinto et al., 2013 ; Fadli et al., 2012 ; Asdadi et al., 2014 ; Kamdem et al., 2015**).

L'activité antifongique des HE est le sujet de plusieurs études scientifiques *in vitro* depuis plusieurs années. Cependant, les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur (**Tableau 3.6**). En règle générale et quelque soit la méthodologie utilisée (aromatogramme, microatmosphère ou dilution en milieu gélosé), il apparaît clairement que le potentiel antimycosique de l'extrait aromatique du thym commun est toujours remarquable. Ceci a été corroboré par plusieurs études antérieures (**Pozzatti et al., 2008 ; Khan et al., 2014**).

3.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique *in vivo*

Eu égard du fait que la majorité des HE sont appliquées localement (voie cutanée), nous nous sommes assignés comme objectif l'étude de l'activité anti-inflammatoire topique via la réduction de l'œdème induit, dans les oreilles des souris, par l'huile de croton. Les résultats de la réduction de l'inflammation, à travers la mesure de la différence de poids entre les des oreilles droite-gauche (DPO) des animaux des différents lots (Témoins et essais), sont consignés dans le **Tableau 3.7**.

Tableau 3.7. Réduction de l'inflammation topique induite dans les oreilles droites des souris.

Traitement	Dose ($\mu\text{L}/\text{kg}$)	DPO ($\text{m} \pm \text{ET}$)	% Réduction œdème
T-		$6.41 \pm 2.45^{\text{B}}$	-
HE	2.5	$1.98 \pm 0.29^{\text{A}}$	73.00
HE	0.25	$2.33 \pm 0.20^{\text{A}}$	68.02
HE	0.01	$2.49 \pm 1.15^{\text{A}}$	65.69
T+		$1.82 \pm 0.36^{\text{A}}$	73.52

T- : Témoin négatif (eau physiologique, 0.9% NaCl) ; T+ : Témoin positif : Voltarène® (Diclofénac, Emulgel® 1%); DPO: Différence de Poids (g) entre les Oreilles droite-gauche ; HE : Huile Essentielle ; m \pm ET : Moyenne \pm Ecart-Type. Les lettres alphabétiques identiques dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative ($P > 0.05$) au risque de 5% avec le test ANOVA suivi par un test post-hoc de comparaison par paire de Tukey.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire rapportés dans le **Tableau 3.7** montrent les variations du pourcentage de réduction de l'œdème des différents essais (T+ et HE), en comparaison avec le contrôle négatif (lot traité avec de l'eau physiologique).

L'application d'un agent irritant (huile de croton), au niveau des oreilles droites, a provoqué des dommages aux cellules accompagnés d'un œdème et ce dans tous les lots. Le lot traité avec l'eau physiologique (Témoin -) est celui qui a présenté un poids en gonflement et un taux d'œdème le plus important (6.41 g). En revanche, le lot traité avec un gel anti-inflammatoire (Voltarène®) est celui qui a présenté un taux d'œdème le plus faible (1.82 g). Aussi et avec celui traité localement avec l'HE à 2.5 $\mu\text{L}/\text{kg}$, ce sont les deux lots qui ont répondu le mieux au traitement avec un taux de réduction de l'œdème le plus élevé (73.52% et 73.00%, respectivement).

A ce jour et d'après la littérature scientifique, il n'existe aucun rapport ou publication scientifique rapportant l'action anti-inflammatoire topique de l'essence du *Thymus vulgaris*. De ce fait, notre travail demeure le premier à mettre en exergue cette activité thérapeutique *in vivo*. Parallèlement, d'autres HE distillée de différentes plantes à parfum ont été testées pour la même propriété curative. Nous citerons l'étude d'**Al-Reza et al. (2010)** sur les propriétés anti-inflammatoires des HE des graines de Jujubier (*Ziziphus jujuba*). Les auteurs de cette étude ont rapporté que le traitement avec cette huile, par voie cutanée et à la concentration de 1 et 10%, a permis une réduction significative du gonflement des oreilles des souris de 0.3 et 0.35 mm, respectivement. Ils ont démontré aussi que cette activité est supérieure à celle d'un anti-inflammatoire de référence (Hydrocortisone). De plus, il a été trouvé que la réduction d'œdème était de 51 et 53% pour les deux dilutions d'HE utilisées. Il apparait que, d'après la littérature scientifique, la voie cutanée reste la plus adéquate pour un effet significatif (**Su et al., 2010**).

Le thym a toujours été utilisé pour soigner les blessures et certaines affections cutanées mineures grâce à ses propriétés antiseptiques. Il présente aussi bien une activité antifongique (**Manou et al., 1998 ; Mahmoud et al., 1994**) (en stoppant la croissance des champignons), qu'une activité antimicrobienne (**Hu et al., 2009**) (par un mécanisme encore mal connu). De plus, en favorisant l'inhibition de la synthèse des prostaglandines (**Wagner et al., 1986**) (des médiateurs lipidiques impliqués dans l'inflammation), le thym agit comme un anti-inflammatoire (**Anamura et al., 1988**) (diminution de la douleur, du gonflement, etc.).

On recherche depuis de nombreuses années, dans l'industrie pharmaceutique, des substances permettant de traiter l'inflammation. A cet égard, nombreuses sont celles qui ont déjà été décrites, connue dans la littérature sous les appellations d'Anti-Inflammatoires Stéroïdiens ou Non-Stéroïdiens (AIS ou AINS). Outre que les anti-inflammatoires connus présentent souvent des effets secondaires non négligeables, il demeure intéressant de disposer de nouveaux produits à activité anti-inflammatoire, notamment pour des affections cutanées mineures. L'essence du thym commun pourra faire partie intégrante de l'arsenal thérapeutique dans la lutte contre les pathologies inflammatoires.

3.4. Étude anatomopathologique

Pour confirmer, à échelle cellulaire, l'activité anti-inflammatoire topique déjà explorée par le test de l'œdème aux oreilles induit par l'huile de croton, nous avons réalisé des coupes histopathologiques au niveau des oreilles droites de toutes les souris par la technique de coloration Hématoxyline-Eosine, en comparaison avec le contrôle négatif (sans traitement). Les observations, accomplies par microscopie photonique, sont rapportées dans la **Figure 3.6**.

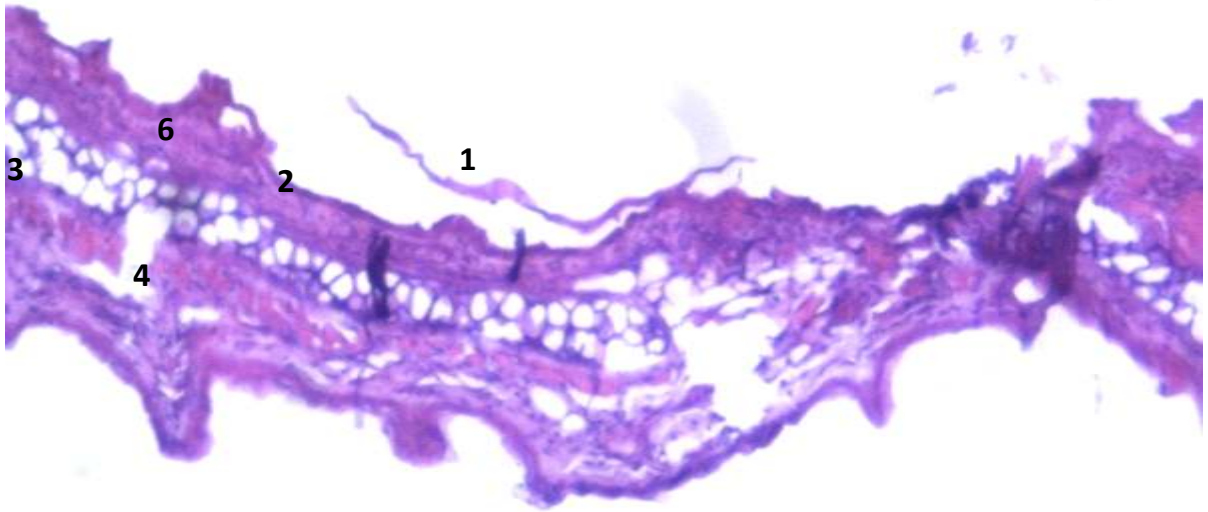
Chez le lot Témoin + traité par un gel anti-inflammatoire (Voltarène®), nous avons noté une faible présence d'œdème et une inflammation neutrophilique d'intensité minimale au niveau du derme superficiel (**Figure 3.6 D**). En revanche, chez le lot Témoin- traité par l'eau physiologique, un taux d'inflammation suppurée d'intensité sévère (polynucléaires neutrophiles (PNN) dégénérés) a été constaté au niveau du derme, de l'épiderme, du tissu musculaire et cartilagineux (**Figure 3.6 E**) des oreilles droites. Ceci démontre l'efficacité du médicament anti-inflammatoire (Diclofenac) dans la réduction de l'œdème et la diminution des PNN, en comparaison avec le contrôle négatif.

Concernant les lots traités avec l'huile aromatique du thym, une inflammation suppurée (PNN), d'intensité minimale et concernant le derme ainsi que le tissu musculaire et cartilagineux (**Figure 3.6 C**), a été signalé chez le lot traité par une dose de 2.5 µL/kg d'HE. Ces résultats semblent être en contradiction avec l'observation macroscopique (test de l'œdème induit par l'huile de croton) où le taux de réduction de l'œdème a été très élevé (73.00%) et statistiquement comparable ($p > 0.05$) à celui du contrôle positif.

En revanche et chez le lot traité avec une dose de 0.25 µL/kg d'HE, l'étude histopathologique a révélé la présence d'une inflammation mixte à prédominance neutrophilique d'intensité minimale localisée au niveau du derme et du muscle sous-jacent (**Figure 3.6 B**). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le lot traité par la plus faible dose en HE (0.05 µL/kg) où l'observation microscopique a dévoilé la présence d'une inflammation lympho histiocytaire d'intensité minimale (**Figure 3.6 A**) concernant uniquement le derme supérieur.

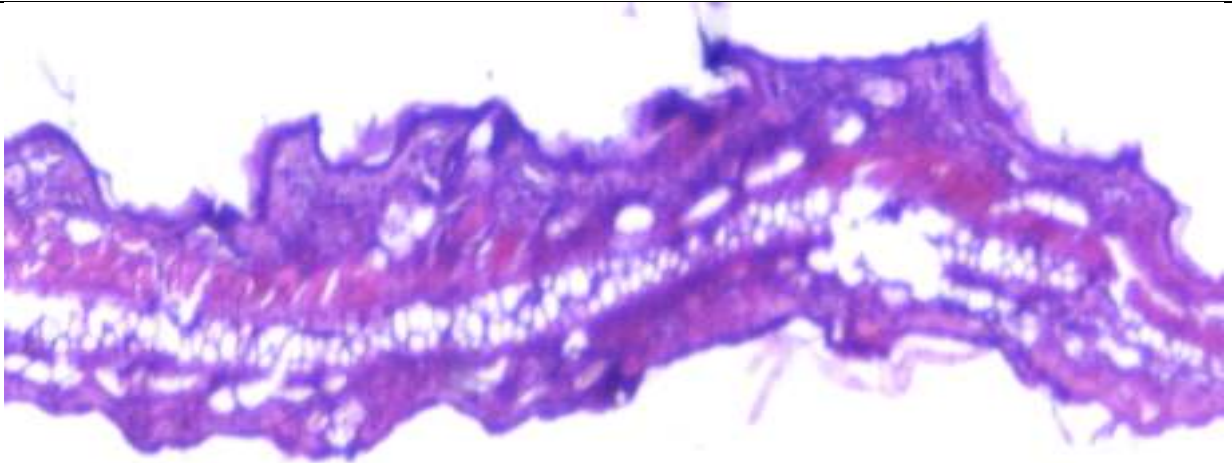
D'une façon générale, les coupes histo-pathologique, réalisées au niveau des oreilles droites des souris, ont dévoilé une diminution de l'œdème et un faible recrutement des PNN dans les lots traités avec l'essence du thym et ce uniquement pour les doses de 0.25 et 0.05 µL/kg d'HE. Aussi, l'intensité de l'inflammation diminue avec la réduction de la dose appliquée en HE. Ceci semble être contradictoire avec l'observation macroscopique où nous avons noté que la réduction d'œdème est en corrélation avec l'augmentation des doses. La seule explication la plus plausible, à notre avis, reste celle de l'effet irritant des huiles du thym au niveau cutané. En effet, beaucoup de travaux ont signalé une certaine toxicité et irritation lors d'une application topique de l'huile pure ou à forte dilution (**Stahl-Biskup et Sáez, 2003 ; Fachini-Queiroz et al., 2012**).

A ce jour, aucune étude histopathologique n'a été faite sur les propriétés anti-inflammatoires cutanées de l'essence de *T. vulgaris*. De même la littérature scientifique reste peu prolixe dans ce domaine. Une étude récente (**Al-Reza et al., 2010**), publiée dans la revue « *Food and Chemical Toxicology* », a confirmé les bienfaits anti-inflammatoires de l'huile essentielle de Jojoba au niveau cellulaire à travers l'observation des coupes histopathologies réalisées sur modèle animal. Les auteurs de ce travail ont mesuré aussi la surface des tissus dermiques et hyper-dermiques de l'oreille. Ils ont constaté que l'épaisseur de la surface a diminué en comparaison avec le contrôle négatif, ce qui est en adéquation avec les résultats trouvés par une étude précédente (**Thakur et Pitre, 2009**). De plus, ils ont signalé que le composé majoritaire de l'huile, à savoir l'eugénol, est doué d'un pouvoir anti-inflammatoire mais reste inférieure à celui de l'HE.

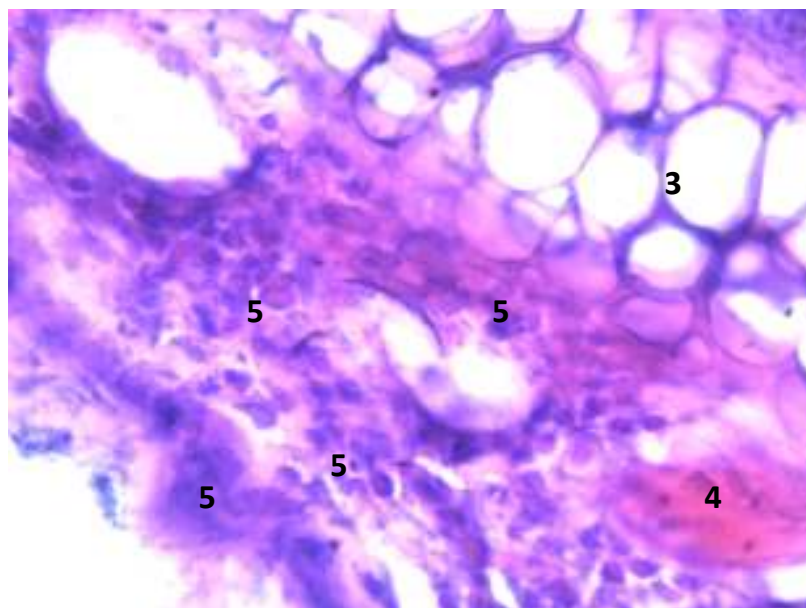


A) Dose HE = 0.05 µL/kg (Gx5)

Inflammation lympho histiocytaire d'intensité minimale (derme supérieur).

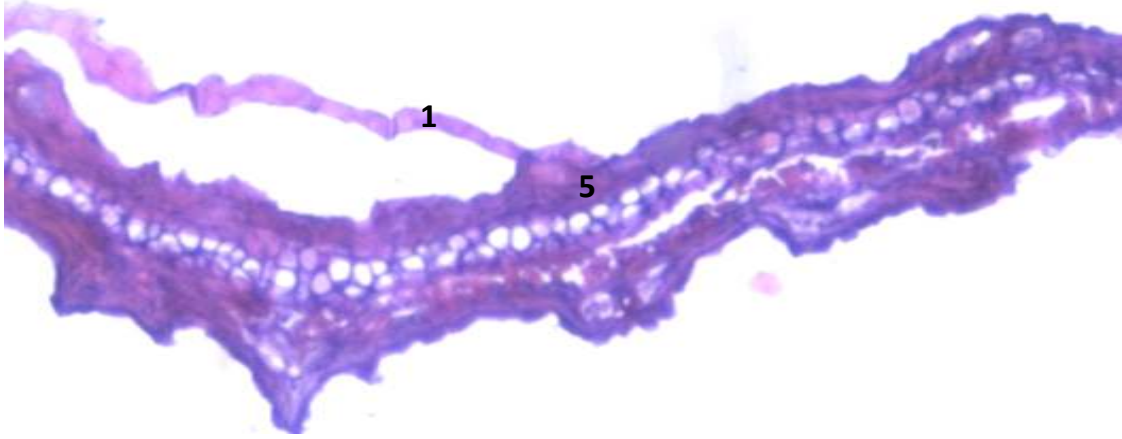


B1) Dose HE = 0.25 µL/kg (Gx5)

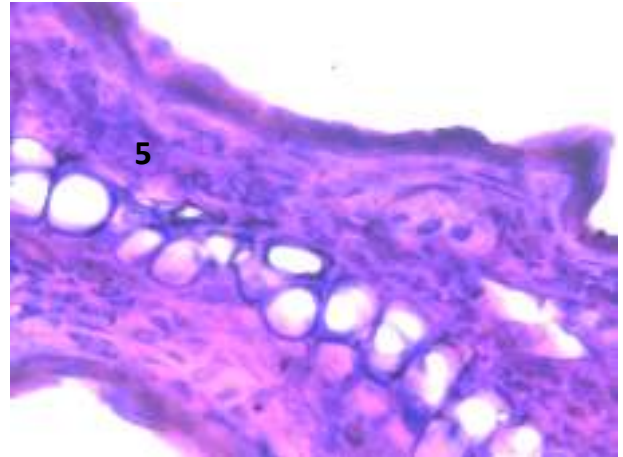
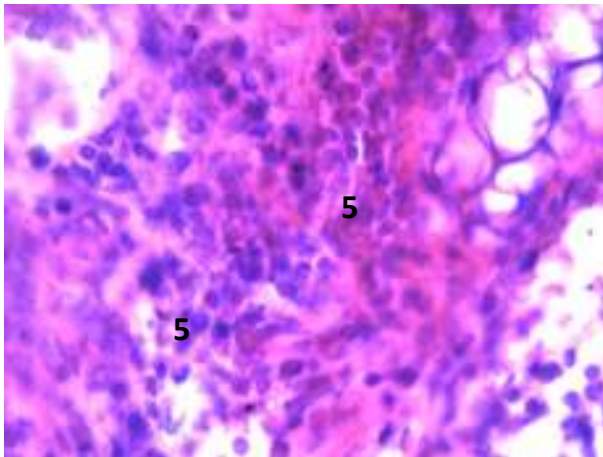


B2) Dose HE = 0.25 µL/kg (Gx40)

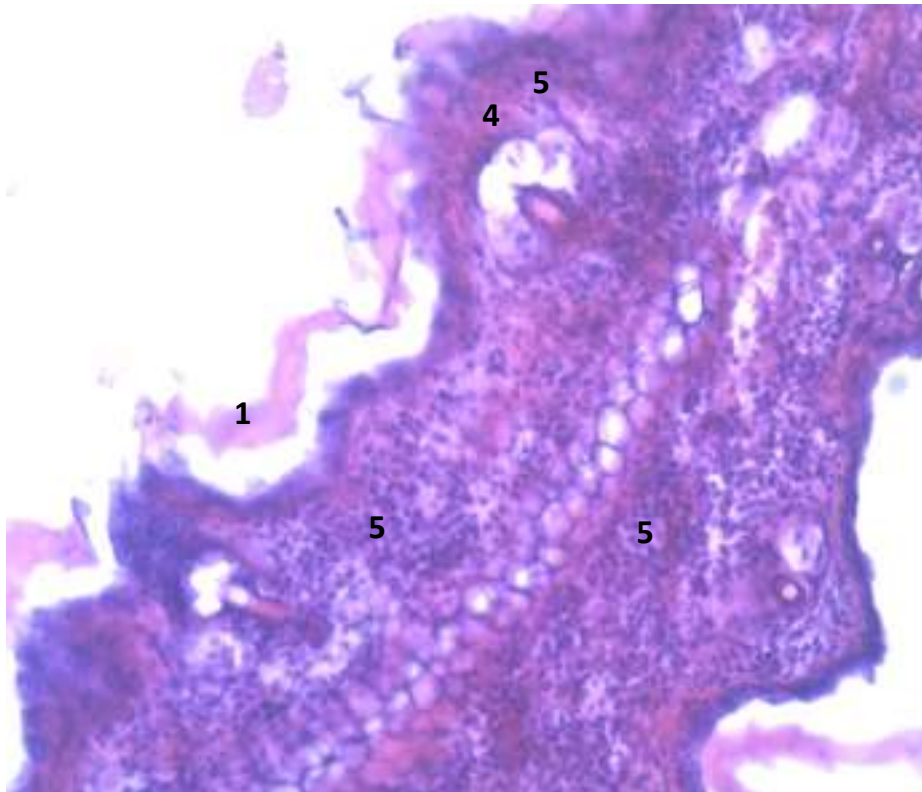
Inflammation mixte à prédominance neutrophilique d'intensité minimale (derme + muscle).



C1) Dose HE = 2.5 μ L/kg (Gx5)

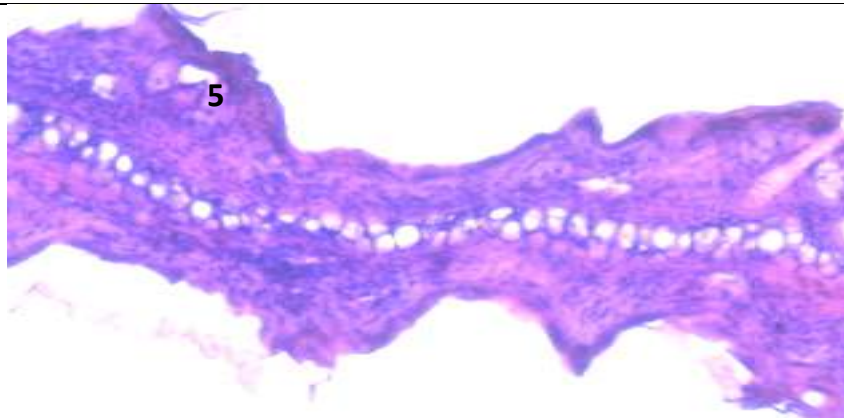


C2) Dose HE = 2.5 μ L/kg (Gx40)

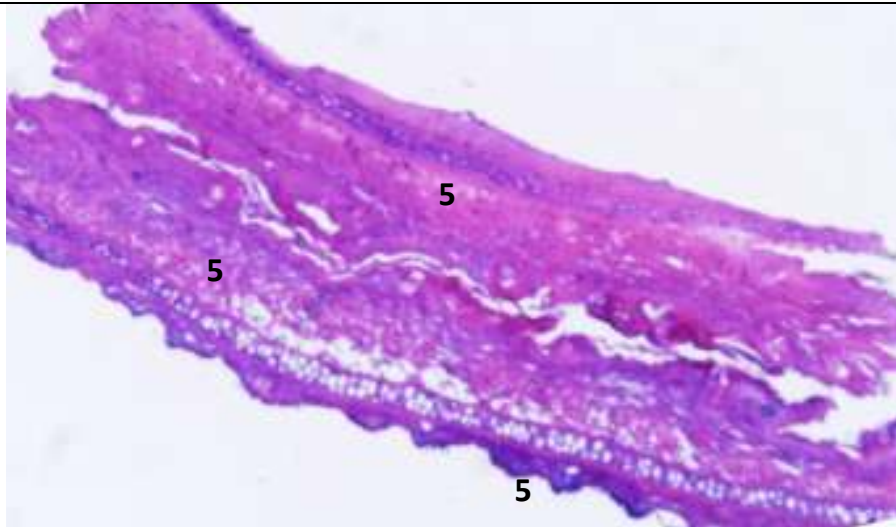


C3) Dose HE = 2.5 μ L/kg (Gx10)

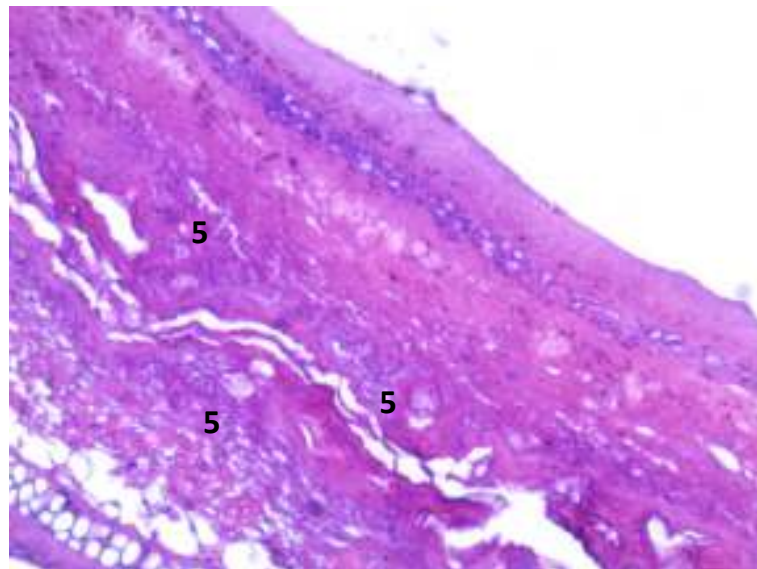
Inflammation suppurée (PNN) minime (derme + muscle + cartilage).



D) Témoin + (Gel Voltarène (Diclofenac)) (Gx10)
Inflammation neutrophilique d'intensité minimale (derme superficiel).



E1) Témoin - (Eau Physiologique) (Gx5)



E2) Témoin - (Eau Physiologique) (Gx10)
Inflammation suppurée (PNN dégénérés) d'intensité sévère (épiderme, derme, muscle, cartilage).

1) Kératine ; 2) Epithélium ; 3) Cartilage ; 4) Muscle ; 5) Polynucléaires Neutrophiles (PNN) ; 6) Derme.

Figure 3.6. Coupes histopathologiques au niveau des oreilles droites de souris de différents lots.
(Originale, 2015)

Les propriétés anti-inflammatoires des huiles terpéniques pourraient résulter aussi d'une action directe ou indirecte sur le système immunologique. L'action directe pourrait être due, par exemple, à l'activité conjuguée du carvacrol et du linalool — des phénols et monoterpénols en général — contribuant à l'augmentation des γ - et β -globulines, ainsi que des Immunoglobulines IgA et donc à une immuno-stimulation. Mais ces mêmes composés réduiraient aussi l'inflammation et une augmentation exagérée des γ -globulines par leur action antibactérienne (action indirecte) (**Maruyama *et al.*, 2008**). Ces propriétés immuno-modulantes sont spécifiques aux huiles essentielles (**Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012**).

En résumé, notre étude anatomo-pathologique a confirmé le pouvoir anti-inflammatoire topique de la fraction aromatique du thym au niveau cellulaire. La réduction de l'inflammation a été appréciée en particulier lorsque la quantité appliquée localement était faible (0.05 μ L/kg). A faible dose, l'usage topique de l'essence du thym commun pourra trouver une place dans l'arsenal thérapeutique comme un ingrédient dans des préparations galéniques à visée anti-inflammatoire. Reste à confronter ces données avec une étude cyto-toxicologique approfondie. Seul l'avenir nous confirmera l'impact réel de ces nouvelles acquisitions.

Conclusion

La thérapeutique des pathologies humaines se base principalement sur l'usage des médicaments de synthèse. La prescription, à grande échelle et parfois inappropriée, de ces agents a entraîné un certain nombre d'effets indésirables ou encore la sélection des souches résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments.

Produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles sont toujours utilisées comme substances aromatisantes en parfumeries, en industrie cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine alternative. En aromathérapie scientifique, il s'agit de mettre en valeur les propriétés biologiques en s'appuyant sur la composition de l'huile essentielle.

Eu égard de l'importance des huiles aromatiques du thym commun en phytothérapie, il nous a semblé nécessaire de consacrer cette étude pour asseoir ses activités antifongique et anti-inflammatoire, en vue de son éventuelle intégration dans l'arsenal thérapeutique.

Le premier objectif de notre étude était de déterminer la composition chimique de l'huile par analyse chromatographique. Cet examen a permis d'identifier et de quantifier 13 constituants où le carvacrol a été décelé comme le composé majoritaire avec une prédominance dépassant les 3/4.

L'autre objectif assigné à ce travail était l'évaluation de l'activité antifongique de l'essence *in vitro* sur une large gamme de souches mycéliennes isolées cliniquement. En aromatogramme et au dosage le plus faible, l'huile a exhibé un pouvoir fongistatique intéressant sur la totalité des isolats fongiques alors qu'une action fongicide a été notée au dosage le plus élevé. Le même constat a été rapporté en utilisant la technique de microatmosphère où la phase vapeur est aussi douée d'un pouvoir inhibiteur, parfois plus élevé que la phase liquide, notamment sur les souches aspergillaires. Cette activité inhibitrice est « dose-dépendante » et paraît plus supérieure à celle de l'Hexomedine (antiseptique). Ces résultats obtenus sont très encourageants pour une éventuelle utilisation dans un projet visant à assainir les ambiances en milieu hospitalier. En outre, Les propriétés antimycosiques de l'huile ont été aussi confirmées par une méthode qualitative de dilution en milieu gélosé.

L'autre volet abordé, lors de cette étude, était la détermination du pouvoir anti-inflammatoire topique de l'essence *in vivo*. Les résultats ont établi l'efficacité de l'huile dans la réduction de l'inflammation topique et la résorption de l'œdème, à toutes les doses utilisées, en comparaison avec le médicament de référence. Cette activité a été corroborée par une étude anatomo-pathologique qui a confirmé les bienfaits thérapeutiques de l'essence (à faible dose) dans la réduction de l'inflammation locale.

Comme perspectives, il serait intéressant d'apprécier l'action antimicrobienne de la fraction aromatique du thym, en comparaison avec les composés majoritaires, afin de tirer des conclusions sur

les possibles effets synergiques entre différents composés, majoritaire et minoritaire. Une approche récente consiste à combiner l'utilisation des métabolites terpéniques avec des antifongiques de synthèse. C'est là une nouvelle stratégie pour surmonter les problèmes de résistance et des effets secondaires inhérents aux médicaments synthétiques.

En outre, il nous paraît utile de tester l'action antimicrobienne des huiles sur un large spectre de germes, en particulier des bactéries multi-résistantes (entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu, staphylocoques résistants à la méthicilline ou à la vancomycine), des bactéries responsables d'altération de la qualité des denrées alimentaires et des germes phytopathogènes.

Le mode d'action des huiles au niveau cellulaire des germes microbiens a été rarement abordé, de même que la cinétique d'inhibition au cours de la croissance microbienne. Pour améliorer la compréhension des altérations cellulaires observées, un travail plus approfondi, impliquant les molécules actives des HE devra être entrepris. L'observation des effets produits sur l'ultra structure microbienne devra être réalisée en microscopie électronique à transmission.

La cytotoxicité des molécules terpéniques devra être également explorée sur cultures cellulaires, avant d'être évaluée *in vivo*. Après ces nombreux tests toxicologiques, les molécules à activité thérapeutiques pourront servir de base au développement de nouveaux médicaments.

En définitive, l'objectif premier de notre travail a été atteint puisque nous avons contribué à valoriser la fraction aromatique du thym commun en aromathérapie anti-infectieuse ou comme ingrédient actif dans la réduction de l'inflammation locale. L'essence de cette plante à parfum peut constituer les prémisses d'une nouvelle ère d'industrialisation pour un intérêt thérapeutique futur. En plus de cet apport thérapeutique, le gain économique ne serait pas négligeable puis qu'il s'agit de valoriser le patrimoine végétal de notre pays et promouvoir la culture et l'exploitation industrielle des plantes à parfum.

Références Bibliographiques

1. Abedini, S., Sahebkar, A., & Hassanzadeh-Khayyat, M. (2014). Chemical Composition of the Essential Oil of *Thymus vulgaris* L. Grown in Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(3), 538-543.
2. Abyaneh, M. R., & Rai, M. (2013). *Antifungal Metabolites from Plants*. Springer-Verlag, Allemagne.
3. Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Publishing Corporation, 4^{ème} édition, Pennsylvanie, USA.
4. AFNOR. (2000). *Recueil des Normes Françaises : Huiles Essentielles*. Editions AFNOR, Paris, France.
5. Al-Reza, S. M., Yoon, J. I., Kim, H. J., Kim, J. S., & Kang, S. C. (2010). Anti-inflammatory activity of seed essential oil from *Zizyphus jujuba*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 639-643.
6. Al-Tawaha, A., Al-Karaki, G., & Massadeh, A. (2014). Variation of chemical composition, antioxidant and total phenols of essential from thyme (*Origanum syriacum* L.) grown under open field conditions and protected soilless condition. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 8(12), 20-26.
7. Anamura, S., Dohi, T., Shirakawa, M., Okamoto, H., and Tsujimoto, A. Effects of phenolic dental medicaments on prostaglandin synthesis by microsomes of bovine tooth pulp and rabbit kidney medulla. *Archives of Oral Biology* 1988;33(8):555-560.
8. Asdadi, A., Alilou, H., Akssira, M., Chebli, B., & Moutaj, R. (2014). Chemical composition and anticandidal effect of three *Thymus* species essential oils from southwest of Morocco against the emerging nosocomial Fluconazole-Resistant strains. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(11), 16-26.
9. Babaei, M., Abarghoei, M. E., Ansari, R., Vafaei, A. A., Taherian, A. A., Akhavan, M. M., & Mousavi, S. (2008). Antispasmodic effect of hydroalcoholic extract of *Thymus vulgaris* on the guinea-pig ileum. *Natural Product Research*, 22(13), 1143-1150.
10. Badi, H. N., Yazdani, D., & Nazari, F. (2004). Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 19(3), 231-236.
11. Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21(1), 33-42.
12. Basch, E., Ulbricht, C., Hammerness, P., Bevins, A., & Sollars, D. (2004). Thyme (*Thymus vulgaris* L.), thymol. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 4(1), 49-67.
13. Baudoux, D. (2001). *L'aromathérapie - Se soigner par les huiles essentielles*. Edition Atlantica, 200-204.
14. Baudoux D, Zhiri A. 2009. *Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies*, Edition Inspir Development.
15. Braun, L., & Cohen, M. (2015). *Herbs and Natural Supplements, Volume 1: An Evidence-Based Guide*. Elsevier Health Sciences.
16. Büechli, S., Vögelin, R., von Eiff, M. M., Ramos, M., & Melzer, J. (2005). Open trial to assess aspects of safety and efficacy of a combined herbal cough syrup with ivy and thyme. *Research in Complementary Medicine*, 12(6), 328-332.
17. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
18. Cacciatore, I., Di Giulio, M., Fornasari, E., Di Stefano, A., Cerasa, L. S., Marinelli, L., & Cellini, L. (2015). Carvacrol Codrugs: A New Approach in the Antimicrobial Plan. *PLoS ONE*, 10(4): e0120937.
19. Carmo, E. S., Lima, E. D. O., Souza, E. L. D., & Sousa, F. B. D. (2008). Effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on the rowth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 91-97.
20. Chaillot, J., Tebbji, F., Remmal, A., Boone, C., Brown, G. W., Bellaoui, M., & Sellam, A. (2015). The monoterpene carvacrol generates endoplasmic reticulum stress in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC-00551.

21. Chalchat, J. C., Garry, R. P., Menut, C., Lamaty, G., Malhuret, R., & Chopineau, J. (1997). Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 9(1), 67-75.
22. Chami, F. (2005). Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo*: Application dans la prophylaxie et le traitement de la candidose vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de Doctorat d'Etat Es-Sciences en Biologie (Pharmacologie expérimentale), Faculté des Sciences Dhar El Mehrez, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fès, Maroc.
23. Chavan, P. S., & Tupe, S. G. (2014). Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control*, 46, 115-120.
24. Cheurfa, M., Allem, R., Sebaihia, M., & Belhireche, S. (2013). Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les bactéries pathogènes responsables de gastroentérites. *Phytothérapie*, 11(3), 154-160.
25. Clarke, S. (2009). *Essential chemistry for aromatherapy*. Elsevier Health Sciences.
26. De Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L., & Dargent, R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(1), 9-17.
27. De Billerbeck, V. G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5(5), 249-253.
28. De Carvalho, R. J., de Souza, G. T., da Conceição, M. L., Maganani, M., & de Souza, E. L. (2015). Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiology*, 52, 59-65.
29. Deletre, E., Chandre, F., Williams, L., Duménil, C., Menut, C., & Martin, T. (2015). Electrophysiological and behavioral characterization of bioactive compounds of the *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon winterianus*, *Cuminum cyminum* and *Cinnamomum zeylanicum* essential oils against *Anopheles gambiae* and prospects for their use as bednet treatments. *Parasites & Vectors*, 8(1), 316.
30. Direkvand-Moghadam, A., & Khosravi, A. (2012). The impact of a novel herbal Shirazi *Thymus vulgaris* on primary dysmenorrhea in comparison to the classical chemical Ibuprofen. *Journal of Research in Medical Sciences*, 17(7), 668.
31. Dursun, N., Liman, N., Özyazgan, I., Günes, I., & Saraymen, R. (2003). Role of thymus oil in burn wound healing. *Journal of Burn Care & Research*, 24(6), 395-399.
32. El-Nekeety, A. A., Mohamed, S. R., Hathout, A. S., Hassan, N. S., Aly, S. E., & Abdel-Wahhab, M. A. (2011). Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicon*, 57(7), 984-991.
33. Ernst, E., März, R., & Sieder, C. (1997). A controlled multi-centre study of herbal versus synthetic secretolytic drugs for acute bronchitis. *Phytomedicine*, 4(4), 287-293.
34. Esmaeili, D., Mobarez, A. M., & Tohidpour, A. (2012). Anti-helicobacter pylori activities of shoya powder and essential oils of *Thymus vulgaris* and *Eucalyptus globulus*. *The Open Microbiology Journal*, 6, 65.
35. Ezz, A. L. (2009). Plant growth strategies of *Thymus vulgaris* L. in response to population density. *Industrial Crops and Products*, 30(3), 389-394.
36. Fabio, A., Cermelli, C., Fabio, G., Nicoletti, P., & Quaglio, P. (2007). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytotherapy Research*, 21(4), 374-377.
37. Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Cunha, J. M., Grespan, R., & Cuman, R. K. N. (2012). Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. doi:10.1155/2012/657026
38. Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pagès, J. M., & Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection—bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 19(5), 464-471.

39. Fine, D. H., Furgang, D., Barnett, M. L., Drew, C., Steinberg, L., Charles, C. H., & Vincent, J. W. (2000). Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(3), 157-161.
40. 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*. *Phytotherapy Research*, 18(12), 990-995.
41. Giordani, R., Hadeif, Y., & Kaloustian, J. (2008). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79(3), 199-203.
42. Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). *Phytothérapie anti-infectieuse*. Springer Science & Business Media.
43. Grespan, R., Aguiar, R. P., Giubilei, F. N., Fuso, R. R., Damião, M. J., Silva, E. L., & Cuman, R. K. N. (2014). Hepatoprotective effect of pretreatment with *Thymus vulgaris* essential oil in experimental model of acetaminophen-induced injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
44. Gruenwald, J., Graubaum, H. J., & Busch, R. (2004). Efficacy and tolerability of a fixed combination of thyme and primrose root in patients with acute bronchitis. A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arzneimittel-Forschung*, 55(11), 669-676.
45. Gruenwald, J., Graubaum, H. J., & Busch, R. (2005). Evaluation of the non-inferiority of a fixed combination of thyme fluid and primrose root extract in comparison to a fixed combination of thyme fluid extract and primrose root tincture in patients with acute bronchitis. A single-blind, randomized, bi-centric clinical trial. *Arzneimittel-Forschung*, 56(8), 574-581.
46. Guerra-Boone, L., Alvarez-Román, R., Alvarez-Román, R., Salazar-Aranda, R., Torres-Cirio, A., Rivas-Galindo, V. M., & Pérez-López, L. A. (2015). Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28, 363-9.
47. Guillen, M. D., & Manzanos, M. J. (1998). Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant. *Food Chemistry*, 63(3), 373-383.
48. Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590-3595.
49. Hu, Y., Du, Y., Wang, X., and Feng, T. Self-aggregation of water-soluble chitosan and solubilization of thymol as an antimicrobial agent. *Journal of Biomedical and Material Research A* 9-1-2009;90(3):874-881
50. Hussain, S. S., Agoumi, A., Amghar, S., & Boukachabine, K. (2011). Anticandida activity of the marketed essential oil of *Thymus vulgaris* L. and its concomitant action with amphotericin B. *Thérapie*, 66(2), 167-169.
51. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3.
52. Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathélet, J. P., Ankit, M., Khedid, K., & El Bachiri, A. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(2), 205-208.
53. Iannitelli, A., Grande, R., Di Stefano, A. (2011) Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(8): 5039-51.
54. Inouye, S., & Abe, S. (2007). Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*, 5(1), 2-4.
55. Inouye, S., Uchida, K., & Yamaguchi, H. (2001). In-vitro and in-vivo anti-*Trichophyton* activity of essential oils by vapour contact. *Mycoses*, 44(3-4), 99-107.
56. Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2013). *La connaissance des huiles essentielles: qualité et aromathérapie*. Springer Science & Business Media.
57. Kamdem, M. S., Sameza, M. L., Dongmo, P. M. J., Boyom, F. F., Bakargna-Via, I., Fokou, J. B. H., & Menut, C. (2015). Antiradical, anti-inflammatory and antifungal activities of essential oils of two aromatic plants: *Apium graveolens* (Apiaceae) and *Thymus vulgaris* (Lamiaceae). *Journal of Life Sciences*, 9, 51-64.
58. Kazemi, M. (2015). Phytochemical composition of *Thymus vulgaris* L. essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(3), 751-753.

59. Keefover-Ring, K., Thompson, J. D., & Linhart, Y. B. (2009). Beyond six scents: defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour And Fragrance Journal*, 24(3), 117-122.
60. Kemmerich, B., Eberhardt, R., & Stammer, H. (2005). Efficacy and tolerability of a fluid extract combination of thyme herb and ivy leaves and matched placebo in adults suffering from acute bronchitis with productive cough. A prospective, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arzneimittel-Forschung*, 56(9), 652-660.
61. Kemmerich, B. (2006). Evaluation of efficacy and tolerability of a fixed combination of dry extracts of thyme herb and primrose root in adults suffering from acute bronchitis with productive cough. A prospective, double-blind, placebo-controlled multicentre clinical trial. *Arzneimittel-Forschung*, 57(9), 607-615.
62. Khan, M. S., Ahmad, I., Cameotra, S. S., & Botha, F. (2014). Sub-MICs of *Carum copticum* and *thymus vulgaris* influence virulence factors and biofilm formation in *Candida* spp. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 14(1), 337.
63. Klarić, S. M., Kosalec, I., Mastelić, J., Pieckova, E., & Pepeljnak, S. (2007). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters In Applied Microbiology*, 44(1), 36-42.
64. Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., Kokoska, L., & Pavela, R. (2012). Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International*, 47(2), 161-165.
65. Kohiyama, C. Y., Ribeiro, M. M. Y., Mossini, S. A. G., Bando, E., & Machinski, M. (2015). Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food chemistry*, 173, 1006-1010.
66. Komaki, A., Hoseini, F., Shahidi, S., & Baharlouei, N. (2015). Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*.
67. Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2014). Evaluation of antifungal activity of antimicrobial agents on cheddar cheese. *Packaging Technology and Science*, 27(1), 49-58.
68. Laird, K., & Phillips, C. (2012). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. *Letters in Applied Microbiology*, 54(3), 169-174.
69. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (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.
70. Mahmoud, A. L. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Letters in Applied Microbiology*, 1994;19(2):110-113.
71. Mancini, E., Senatore, F., Del Monte, D., De Martino, L., Grulova, D., & De Feo, V. (2015). Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Molecules*, 20(7), 12016-12028.
72. Manou, I., Bouillard, L., Devleeschouwer, M. J., & Barel, A. O. (1998). Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal Of Applied Microbiology*, 84(3), 368-376.
73. Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E., & Romagnoli, C. (2004). Antifungal activity of *Tagetespatula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological Research*, 159(3), 295-304.
74. Martínez-González, M. C., Goday Buján, J. J., Martínez Gómez, W., & Fonseca Capdevila, E. (2007). Concomitant allergic contact dermatitis due to *Rosmarinus officinalis* (rosemary) and *Thymus vulgaris* (thyme). *Contact Dermatitis*, 56(1), 49-50.
75. Martoja, R., Martoja-Pierson, M., & Grassé, P. P. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale* (Vol. 345). Masson, Paris, France.
76. Marzian, O. (2007). Treatment of acute bronchitis in children and adolescents. Non-interventional postmarketing surveillance study confirms the benefit and safety of a syrup made of extracts from thyme and ivy leaves. *MMW Fortschritte der Medizin*, 149(27-28 Suppl), 69-74.
77. Melo, F. H. C., Venâncio, E. T., De Sousa, D. P., De França Fonteles, M. M., De Vasconcelos, S. M. M., Viana, G. S. B., & De Sousa, F. C. F. (2010). Anxiolytic-like effect of Carvacrol

- (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 24(4), 437-443.
78. Miladi, H., Slama, R. B., Mili, D., Zouari, S., & Ammar, E. (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against food-borne pathogens. *Natural Science*, 5(6), 729-739.
 79. Mohammadi, B., Haeseler, G., Leuwer, M., Dengler, R., Krampfl, K., & Bufler, J. (2001). Structural requirements of phenol derivatives for direct activation of chloride currents via GABA A receptors. *European Journal of Pharmacology*, 421(2), 85-91.
 80. Nabavi, S. M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., & Nabavi, S. F. (2015). Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food chemistry*, 173, 339-347.
 81. Naguib, N.Y., 2002. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) growth, oil quality, yield and chemical composition as affected by of chelated iron and two potassium forms. *Journal of Agricultural Sciences*, 10(3), 893-918.
 82. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically—fifth edition. Approved standard M7-A5. NCCLS, Wayne, Pennsylvania USA.
 83. Neri, F., Mari, M., & Brigati, S. (2006). Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. *Plant Pathology*, 55(1), 100-105.
 84. Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C., Calhella, R. C., Fernandes, Â., & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.
 85. Nostro, A., & Papalia, T. (2012). Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(1), 28-35.
 86. Oliva, M., Carezzano, M. E., Giuliano, M., Daghero, J., Zygadlo, J., Bogino, P., & Demo, M. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. *Plant Biology*, 17(3), 758-765.
 87. Pan, P., Barnett, M. L., Coelho, J., Brogdon, C., & Finnegan, M. B. (2000). Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(4), 256-261.
 88. Pavela, R., Vrchotová, N., & Tříska, J. (2009). Mosquitocidal activities of thyme oils (*Thymus vulgaris* L.) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 105(5), 1365-1370.
 89. Pekmezovic, M., Rajkovic, K., Barac, A., Senerović, L., & Arsenijević, V. A. (2015). Development of kinetic model for testing antifungal effect of *Thymus vulgaris* L. and *Cinnamomum cassia* L. essential oils on *Aspergillus flavus* spores and application for optimization of synergistic effect. *Biochemical Engineering Journal*, 99, 131-137.
 90. Perina, F. J., Amaral, D. C., Fernandes, R. S., Labory, C. R., Teixeira, G. A., & Alves, E. (2014). *Thymus vulgaris* essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. *Pest Management Science*, 71: 1371–1378.
 91. Peter, K. V. (2006). *Handbook of herbs and spices* (Vol. 3). Woodhead publishing, Cambridge, England
 92. Pibiri, M. C., & Roulet, C. A. (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse (No. oai: infoscience. epfl. ch: thesis-3311).
 93. Pina-Vaz, C., Gonçalves Rodrigues, A., Pinto, E., Tavares, C., & Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18(1), 73-78.
 94. Pinn, G. (2001). Herbal therapy in respiratory disease. *Australian Family Physician*, 30(8), 775.
 95. Pino, J. A., Estarrón, M., & Fuentes, V. (1997). Essential oil of thyme (*Thymus vulgaris* L.) grown in Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 9(5), 609-610.
 96. Pinto, E., Gonçalves, M. J., Hrimpeng, K., Pinto, J., Vaz, S., Vale-Silva, L. A., & Salgueiro, L. (2013). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus villosus* subsp. *lusitanicus* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Industrial Crops and Products*, 51, 93-99.

97. Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M. J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., & Martinez-de-Oliveira, J. (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 55(10), 1367-1373.
98. Porte, A., & Godoy, R. L. (2008). Chemical composition of *Thymus vulgaris* L.(Thyme) essential oil from the Rio de Janeiro state, Brazil. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73(3), 307-310.
99. Pozzatti, P., Scheid, L. A., Spader, T. B., Atayde, M. L., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2008). *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Canadian Journal Of Microbiology*, 54(11), 950-956.
100. Quézel, P., & Santa, S. (1962). *Nouvelle Flore de l'Algérie 1*. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
101. Rasooli, I., & Abyaneh, M. R. (2004). Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 15(6), 479-483.
102. Rhind, J. P., & Pirie, D. (2012). *Essential oils: a handbook for aromatherapy practice*. Singing Dragon.
103. Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19(7), 681-687.
104. Rus, C., Sumalan, R. M., Alexa, E., Copolovici, D. M., Pop, G., & Botau, D. (2015). Study on chemical composition and antifungal activity of essential oils obtained from representative species belonging to the Lamiaceae family. *Plant, Soil and Environment*, 61(7), 297-302.
105. Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91(4), 621-632.
106. Sallé, J. L. (1991). *Le totum en phytothérapie, approche de la phyto-biothérapie*. Edition Frison-Roche, Paris, France.
107. Sertel, S., Eichhorn, T., Plinkert, P. K., & Efferth, T. (2011). Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*, 31(1), 81-87.
108. Shapiro, S., & Guggenheim, B. (1995). The action of thymol on oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 10(4), 241-246.
109. Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbecke picarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3), 337-344.
110. Shati, A. A., & Elsaid, F. G. (2009). Effects of water extracts of thyme (*Thymus vulgaris*) and ginger (*Zingiber officinalis*) on alcohol abuse. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 1945-1949.
111. Sidali, L., Brada, M., Fauconnier, M. L., & Lognay, G. (2014). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* du Nord d'Algérie. *Phyto Chem & BioSub Journal*, 8(3).
112. Soković, M. D., Marin, P. D., Vajs, V., & Van Griensven, L. J. (2009). Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*, 14(1), 238-249.
113. Sosa, S., Altinier, G., Politi, M., Braca, A., Morelli, I., & Della Loggia, R. (2005). Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, 12(4), 271-277.
114. Souza, S., Trindade, M., Almeida, J. R. G. D. S., Souza Araujo, A. A., Duarte, M. C., & Quintans-Júnior, L. J. (2014). Structure–activity relationship of terpenes with anti-inflammatory profile—A systematic review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 115(3), 244-256.
115. Stahl-Biskup, E. (1991). The chemical composition of Thymus oils: a review of the literature 1960–1989. *Journal of Essential Oil Research*, 3(2), 61-82.
116. Stahl-Biskup, E., & Sáez, F. (2003). *Thyme: the genus Thymus*. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, USA.
117. Stewart, D. (2005). *The Chemistry of Essential Oils Made Simple: God's Love Manifest in Molecules*. Care Publications, Missouri, USA.
118. Su, Y. W., Chao, S. H., Lee, M. H., Ou T. Y., & Tsai, Y. C. (2010). Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E2 production in macrophages. *Planta Medica*, 76, 1666–71.

119. Szczepanik, M., Zawitowska, B., & Szumny, A. (2012). Insecticidal activities of *Thymus vulgaris* essential oil and its components (thymol and carvacrol) against larvae of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). *Allelopathy Journal*, 30(1), 129-142.
120. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126(1), 228-235.
121. Ultee, A., & Smid, E. J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 373-378.
122. Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561-1568.
123. Varga, E., Bardocz, A., Belak, A., Maraz, A., Boros, B., & Horvath, G. (2015). Antimicrobial activity and chemical composition of thyme essential oils and the polyphenolic content of different *Thymus* extracts. *Farmacia*, 63, 3.
124. Vigo, E., Cepeda, A., Perez-Fernandez, R., & Gualillo, O. (2004). In-vitro anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A. 1 murine macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(2), 257-263.
125. Wagner, H., Wierer, M., and Bauer, R. *In vitro* inhibition of prostaglandin biosynthesis by essential oils and phenolic compounds. *Planta Medica*, 1986;(3):184-187.
126. Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R., & Taheri, H. (2008). Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1445-1450.
127. Yu, D., Yuan, Y., Jiang, L., Tai, Y., Yang, X., Hu, F., & Xie, Z. (2013). Anti-inflammatory effects of essential oil in *Echinacea purpurea* L. *Pakistanese Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(2), 403-408.
128. Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.
129. Zeljković, S. Ć., & Maksimović, M. (2015). Chemical composition and bioactivity of essential oil from *Thymus* species in Balkan Peninsula. *Phytochemistry Reviews*, 14(3), 335-352.

ANNEXE (1)

Appareillage, Verrerie et Milieux de culture

Appareillage	Verrerie	Milieu de culture et réactifs
- Agitateur	- Anse de platine	- Acétone
- Bain marie	- Bec bunsen	- DMSO
- Etuves bactériologiques (25°C)	- Flacons stériles	- Huile de croton
- Incubateur	- Disques vierges (9 mm)	- Xylène
- Portoir de tubes à essai	- Boîtes Pétri stériles	- Tween 80
- Réfrigérateur	- Pipettes Pasteurs	- Paraffine
- Balance de précision	- Ecouvillons stériles	- Eau physiologique (0.9%)
- Microtome	- Tubes à essai stériles	- Gélose Sabouraud + Chloramphénicol
- Microscope optique	- Lame et lamelles	- Solution Héxomédine (0.01%)
		- -Ethanol à différentes concentrations

ANNEXE (2)

Etude Statistique

Activité anti-inflammatoire topique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris in vivo*

Analyse de Variance (ANOVA) à sens unique suivie par un test de comparaison par paire de Tukey (5%)
(Statistica, version 8.0, Stat Soft Inc. USA)

- **Résultats sont exprimés en P value**

(en rouge : différence Très Hautement Significative, $P < 0.001$; en noir : différence non significative)

Tukey HSD test; variable DPO (stat thym 24h.sta) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1,5252, df = 25,000

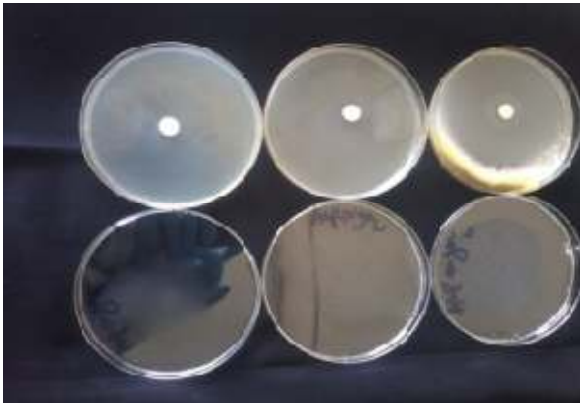
	TRT	{1} - 6,4183	{2} - 1,8283	{3} - 1,9883	{4} - 2,3350	{5} - 2,4917
1	T		0,000142	0,000147	0,000179	0,000214
2	R	0,000142		0,999445	0,952173	0,882456
3	HE 2,5	0,000147	0,999445		0,988017	0,953262
4	HE 0,25	0,000179	0,952173	0,988017		0,999489
5	HE 0,05	0,000214	0,882456	0,953262	0,999489	

- **Résultats exprimés en groupes homogènes**

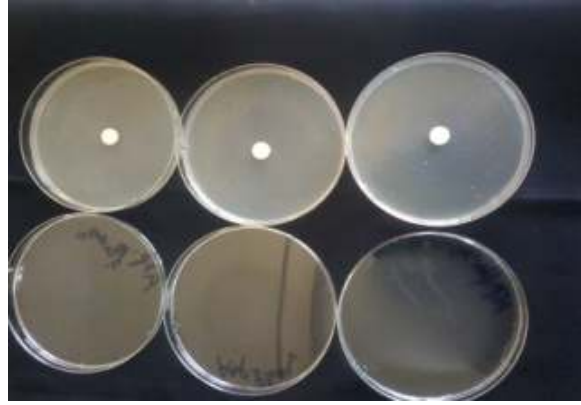
Les lots homogènes (aucune différence significative) ont été regroupés et lui ont été attribués des lettres alphabétiques identiques.

Tukey HSD test; variable DPO (stat thym 24h.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 1,5252, df = 25,000

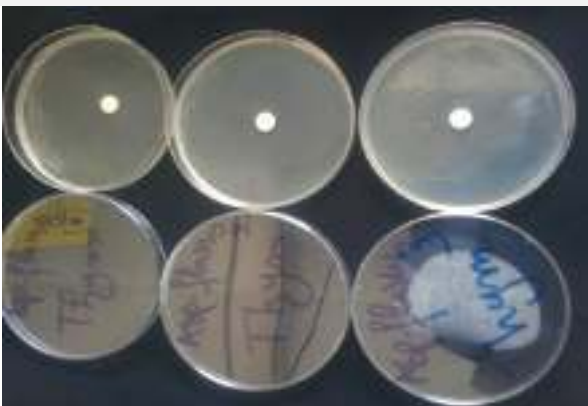
	TRT	DPO - Mean	1	2
2	R	1,828333	a	
3	HE 2,5	1,988333	a	
4	HE 0,25	2,335000	a	
5	HE 0,05	2,491667	a	
1	T	6,418333		B



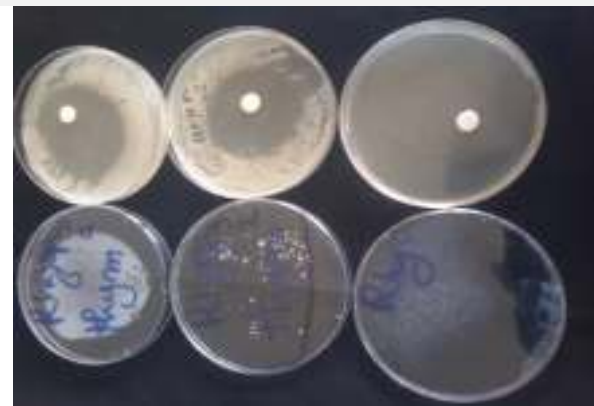
Aspergillus niger



Aspergillus flavus 1



Aspergillus flavus 2



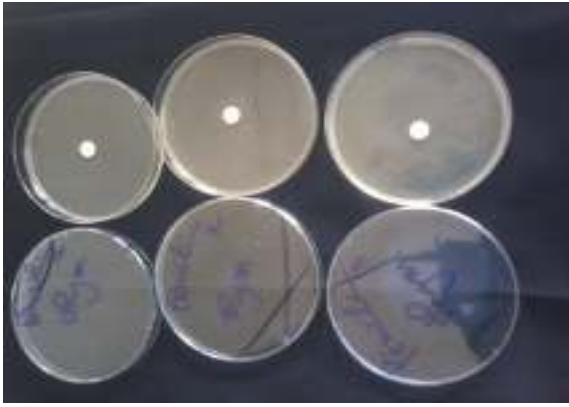
Rhizopus



fusarium



Aspergillus fumigatus



Penicillium



Candida albicans (c.a.)



Candida tropicalis (c.t 1)



Candida tropicalis (c.t 2)



Candida tropicalis (c.t.3)



Candida parapsilosis (c.p.1)



Candida parapsilosis (c.p.2)



Candida parapsilosis (c.p.3)



Trichosporium



Saccharomyces cerevisiae (s.c)



Rhodotorula

Figure : Pouvoir antimicrobien de l'essence en aromatogramme (20, 40 et 60 $\mu\text{L}/\text{disque}$) (Originale, 2015).



Aspergillus niger



Aspergillus flavus 1



Aspergillus flavus 2



Rhizopus



Fusarium



Aspergillus fumigatus

Penicilium



Candida albicans (c.a.)

Candida tropicalis (c.t 1)



Candida tropicalis (c.t.2)



Candida tropicalis (c.t.3)



Candida parapsilosis (c.p.1)



Candida parapsilosis (c.p.2)



Candida parapsilosis (c.p.3)



Trichosporium

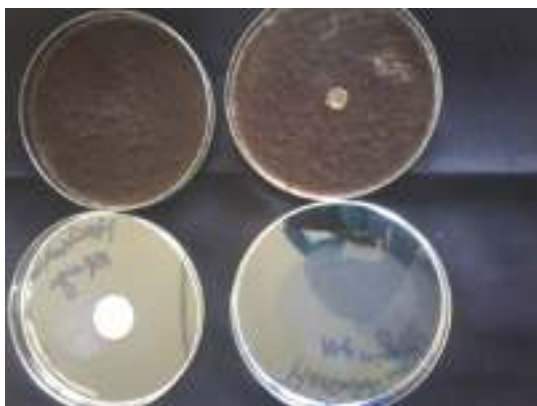


Saccharomyces cerevisiae (s.c)

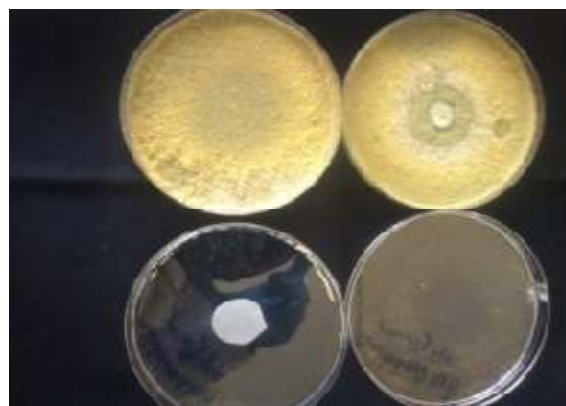


Rhodotorula

Figure : Pouvoir antimicrobien de l'essence en microatmosphère (20, 40 et 60 $\mu\text{L}/\text{disque}$) (Originale, 2015).



Aspergillus niger



Aspergillus flavus 1



Aspergillus flavus 2



Rhizopus



Fusarium



Aspergillus fumigatus

Penicilium



Candida albicans (c.a.)



Candida tropicalis (c.t 1)



Candida tropicalis (c.t.2)



Candida tropicalis (c.t.3)



Candida parapsilosis (c.p.1)



Candida parapsilosis (c.p.2)



Candida parapsilosis (c.p.3)



Trichosporium



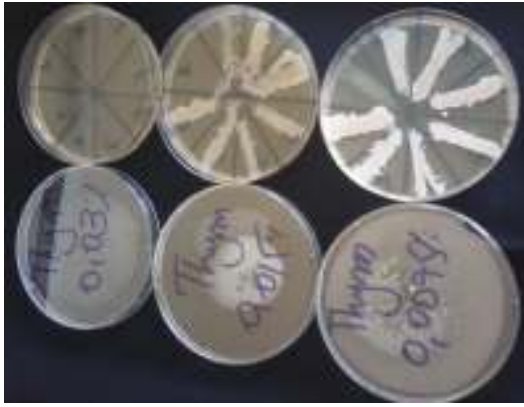
Saccharomyces cerevisiae (s.c)

Rhodotorula

Figure : Pouvoir antimicrobien d'héxomidine en aromatoigramme et microatmosphère (Originale, 2015).

les C.M.I. d'H.E. du *Thymus vulgaris L.* contre les différentes souches testées

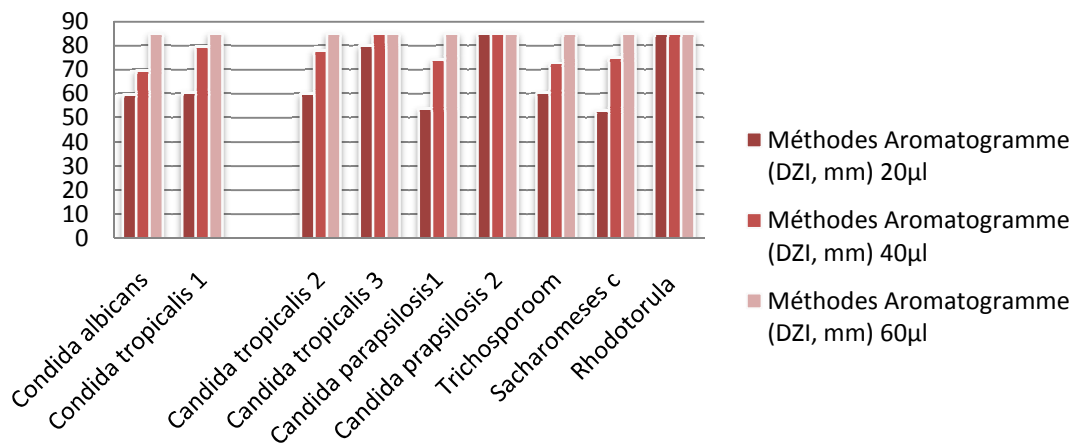




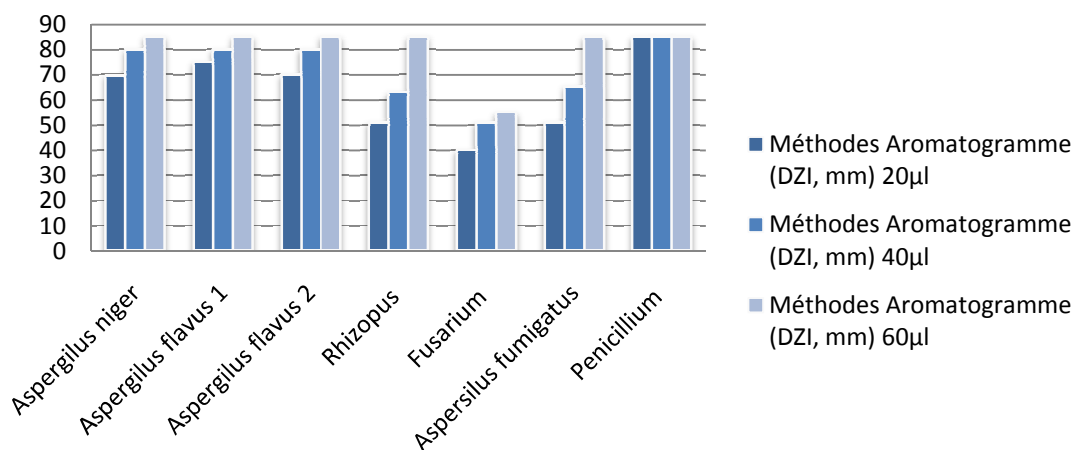
	Méthodes					
	Aromatogramme (DZI, mm)			Microatmosphère (DZI, mm)		
	20µl	40µl	60µl	20µl	40µl	60µl
<i>Candida albicans</i>	60	70	85	61	85	85
	59	70	85	60	85	85
	60	69	85	61	85	85
<i>Candida tropicalis 1</i>	60	80	85	55	75	85
	60	79	85	56	75	85
	62	80	85	54	73	85
<i>Candida tropicalis 2</i>	60	78	85	71	85	85
<i>Candida tropicalis 3</i>	80	85	85	85	85	85
<i>Candida parapsilosis 1</i>	55	75	85	60	80	85
	53	73	85	59	80	85
	54	75	85	60	80	85
<i>Candida parapsilosis 2</i>	85	85	85	85	85	85
<i>Trichosporium</i>	60	73	85	60	75	85
	60	72	85	60	76	85
	61	73	85	59	75	85
<i>Sacharomyces c</i>	53	75	85	69	80	85
<i>Rhodotorula</i>	85	85	85	85	85	85
	85	85	85	85	85	85
	85	85	85	85	85	85
<i>Aspergillus niger</i>	70	80	85	70	85	85
	70	80	85	70	85	85
	69	80	85	71	85	85
<i>Aspergillus flavus 1</i>	75	80	85	67	76	85
	74	80	85	60	75	85
	76	80	85	66	75	85
<i>Aspergillus flavus 2</i>	70	80	85	60	80	85
<i>Rhizopus</i>	51	63	85	35	79	85
<i>Fusarium</i>	40	51	55	52	60	79
<i>Aspergillus fumigatus</i>	50	65	85	57	74	85
	52	65	85	57	74	85
	51	66	85	56	75	85
<i>Penicillium</i>	85	85	85	50	64	85

	Aromatogramme (DZI, mm)	Microatmosphère (DZI, mm)
<i>Candida albicans</i>	15	+
<i>Candida tropicalis 1</i>	25	+
<i>Candida tropicalis 2</i>	+	+
<i>Candida tropicalis 3</i>	+	+
<i>Candida parapsilosis 1</i>	30	+
<i>Candida parapsilosis 2</i>	20	+
<i>Trichosporium</i>	30	45
<i>Sacharomyces c</i>	10	+
<i>Rhodotorula</i>	30	+
<i>Aspergillus niger</i>	+	+
<i>Aspergillus flavus 1</i>	10	8
<i>Aspergillus flavus 2</i>	13	+
<i>Rhizopus</i>	+	+
<i>Fusarium</i>	10	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	13	+
<i>Penicillium</i>	20	+

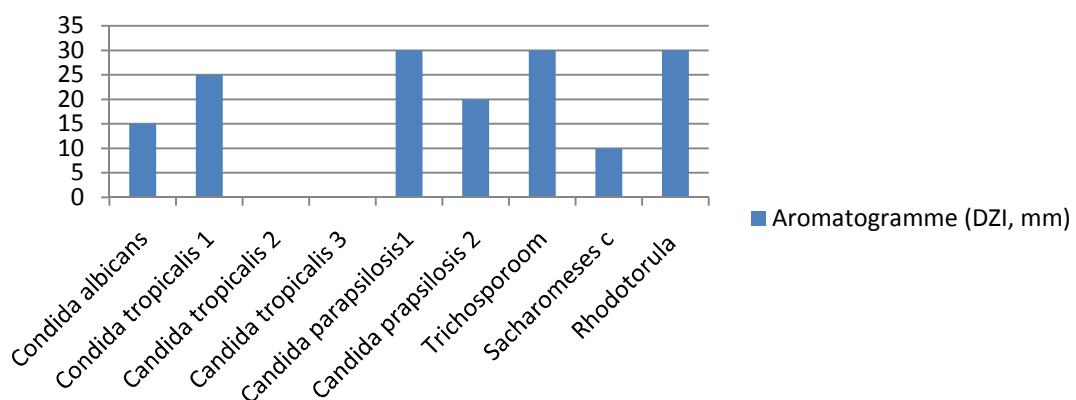
action antifongique des "dose-dépendente" de huile essentielle en aromatogramme (Levures)



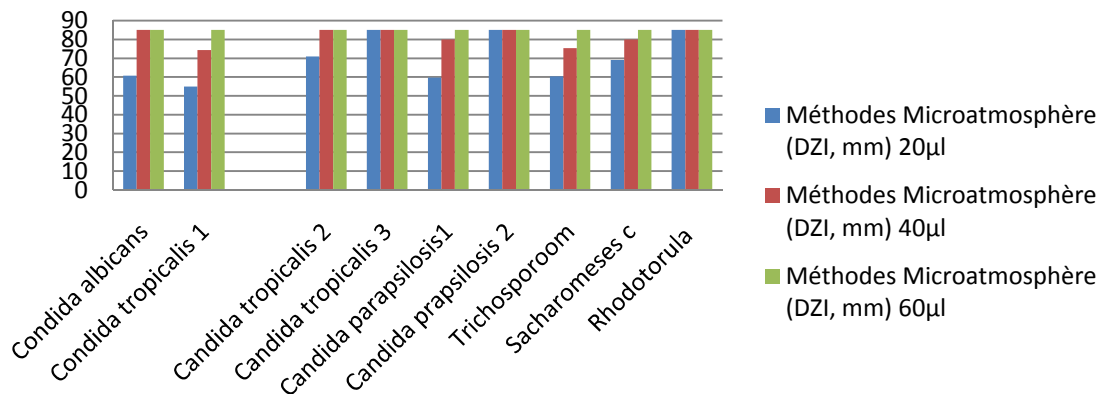
action antifongiques "dose-dépendente" de huile essenteilles en aromatogramme (Moisissures)



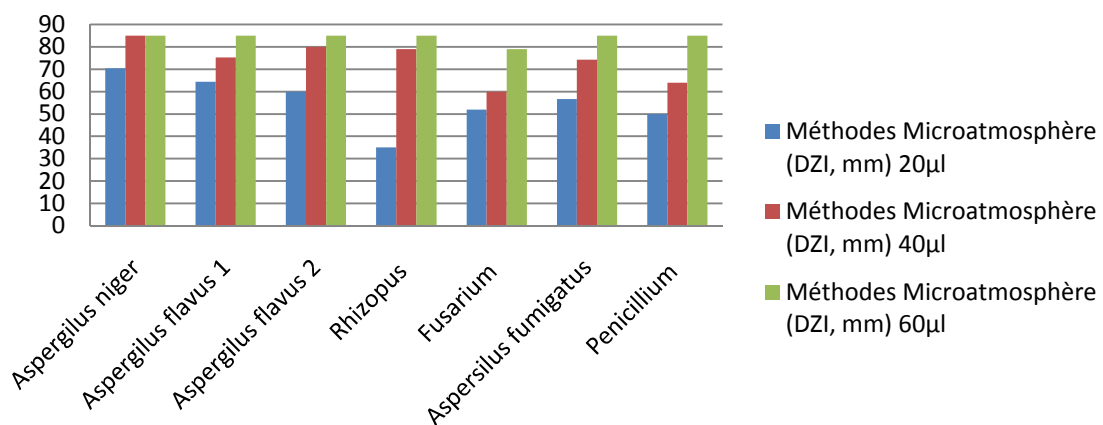
action antifongique d'héxoméline en aromatogramme (DZI, mm) (Levures)



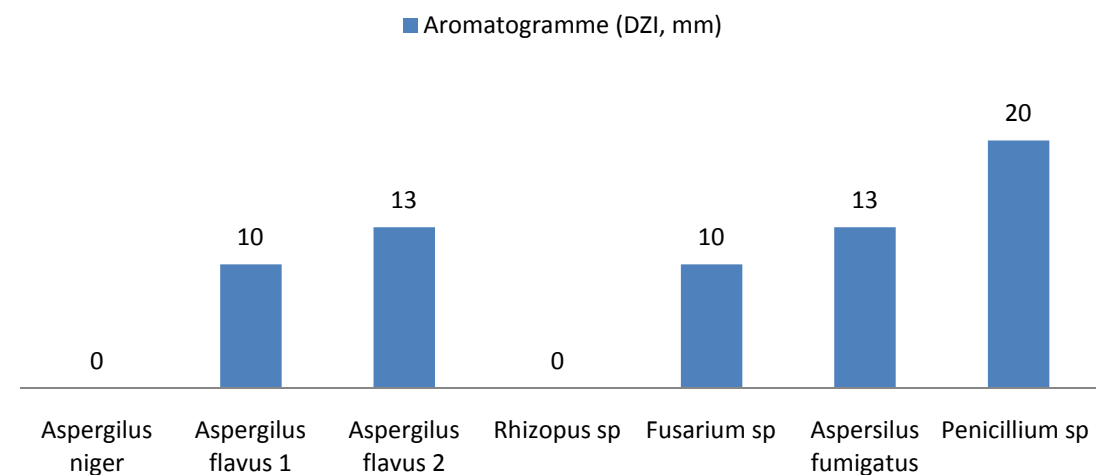
action antifongique "dose-dépendente" en micriatmosphère (DZI,mm) (Levures)



action antifongique "dose-dépendente" en micro-atmosphère (DZI,mm) (Moisissures)

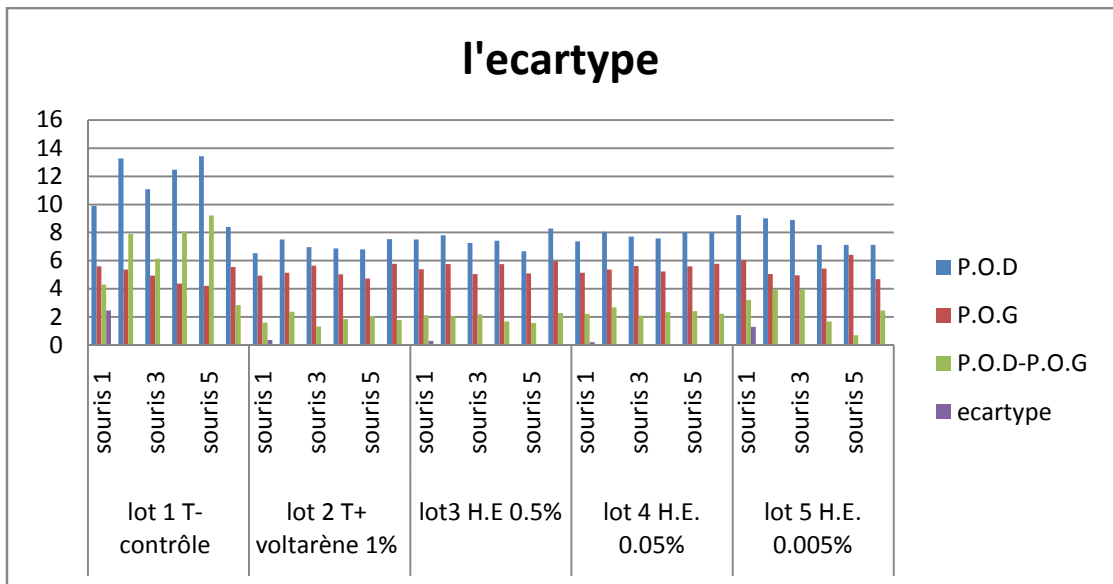
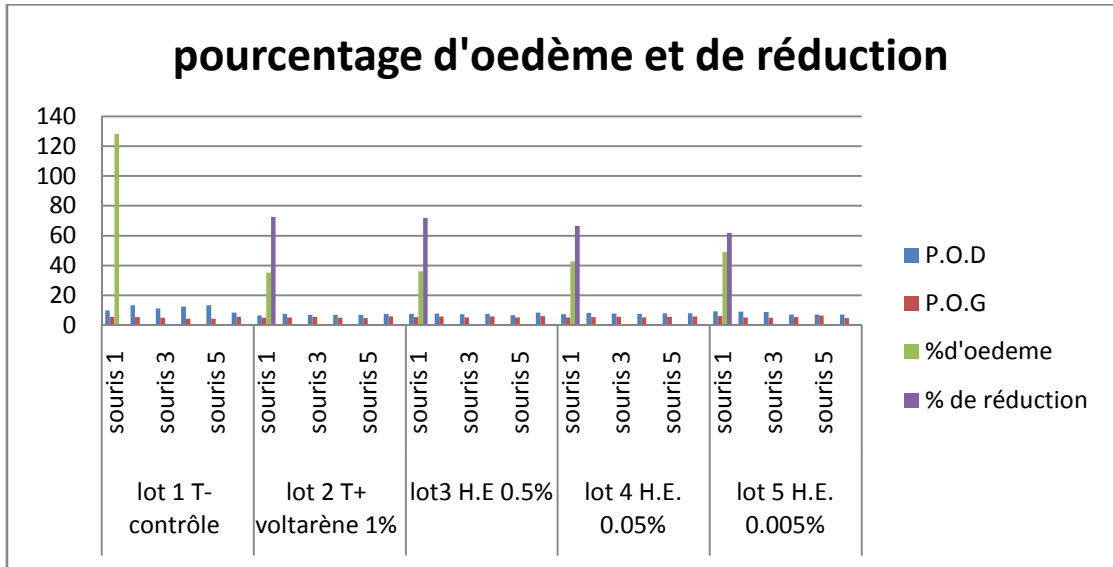


action antifongique de hénomidine Aromatogramme (DZI, mm) les moisissures



		P.O.D	P.O.G		M.P.O.D	M.P.O.G	M.POD-M.POG
lot 1 T- contrôle	souris 1	9.9	5.59	4.31	11.4233333	5.005	6.4183333
	souris 2	13.26	5.36	7.9			
	souris 3	11.09	4.94	6.15			
	souris 4	12.47	4.38	8.09			
	souris 5	13.42	4.2	9.22			
	souris 6	8.4	5.56	2.84			
lot 2 T+ volarène 1%	souris 1	6.54	4.94	1.6	7.03666667	5.20833333	1.83333337
	souris 2	7.5	5.14	2.36			
	souris 3	6.96	5.64	1.32			
	souris 4	6.87	5.02	1.85			
	souris 5	6.81	4.74	2.07			
	souris 6	7.54	5.77	1.77			
lot3 H.E 0.5%	souris 1	7.51	5.4	2.11	7.49166667	5.50333333	1.98833337
	souris 2	7.8	5.75	2.05			
	souris 3	7.25	5.06	2.19			
	souris 4	7.43	5.75	1.68			
	souris 5	6.67	5.09	1.58			
	souris 6	8.29	5.97	2.28			
lot 4 H.E. 0.05%	souris 1	7.37	5.14	2.23	7.79666667	5.46166667	2.335
	souris 2	8.06	5.37	2.69			
	souris 3	7.71	5.62	2.09			
	souris 4	7.59	5.24	2.35			
	souris 5	8.03	5.61	2.42			
	souris 6	8.02	5.79	2.23			
lot 5 H.E. 0.005%	souris 1	9.24	6.03	3.21	8.08833333	5.43	2.65833333
	souris 2	9.02	5.05	3.97			
	souris 3	8.89	4.96	3.93			
	souris 4	7.13	5.44	1.69			
	souris 5	7.12	6.42	0.7			
	souris 6	7.13	4.68	2.45			

%d'oedeme	% de réduction	ecartype
128.238428		2.45604
35.2000007	72.5511289	0.36207
36.1296191	71.8262148	0.28491
42.7525175	66.6616954	0.20762
48.9564149	61.823912	1.30062



Les différentes étapes de l'activité anti inflammatoire

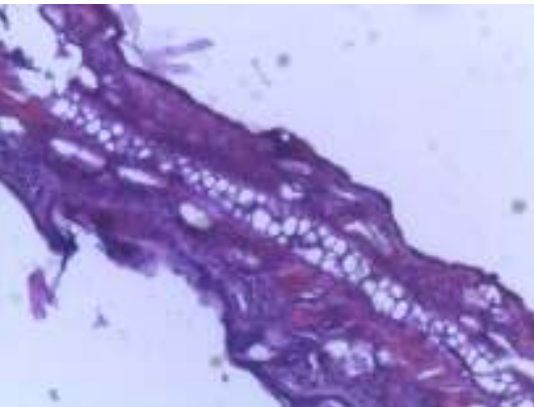
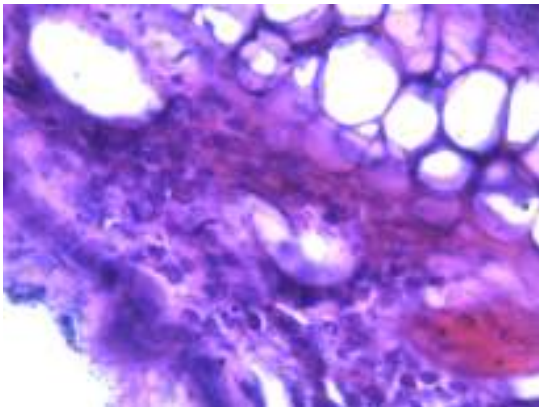
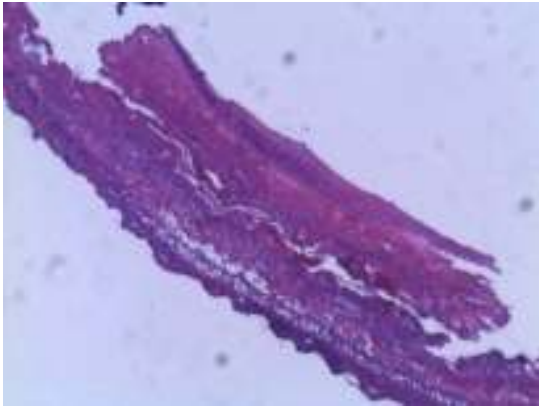


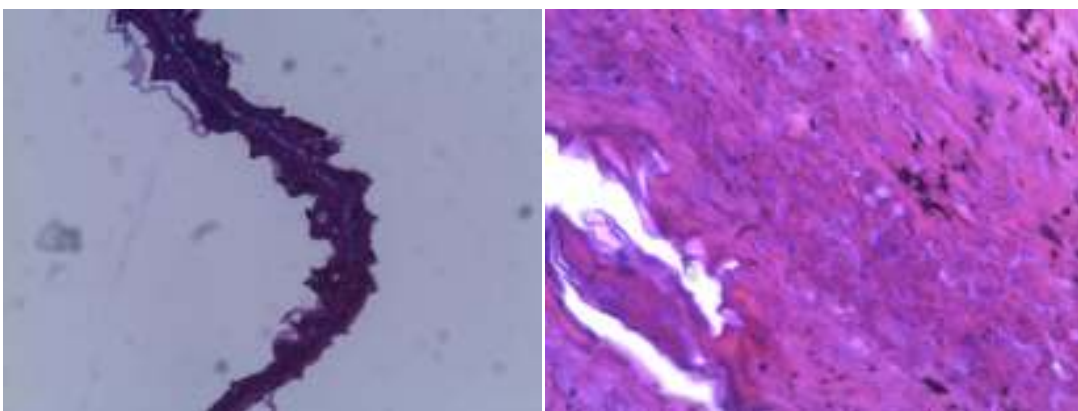
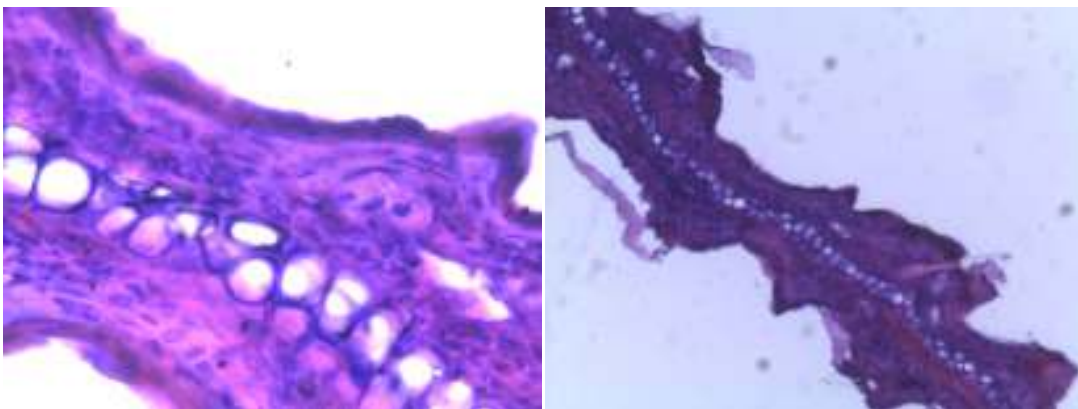
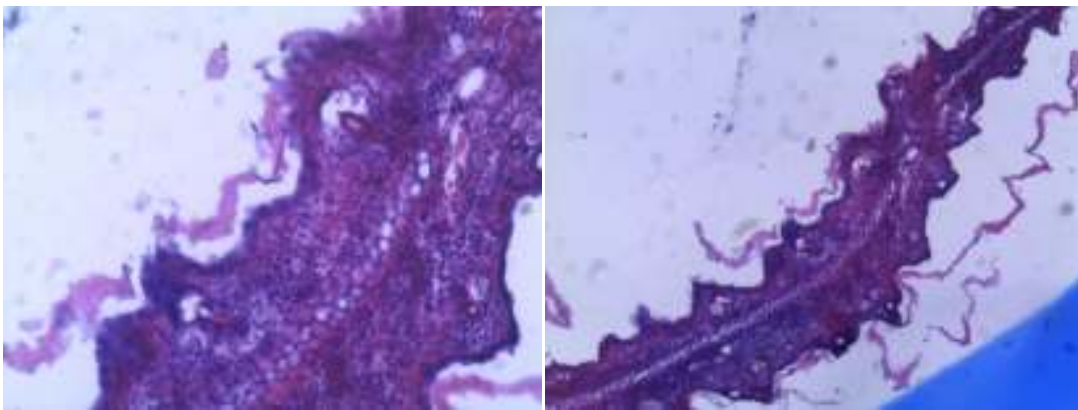
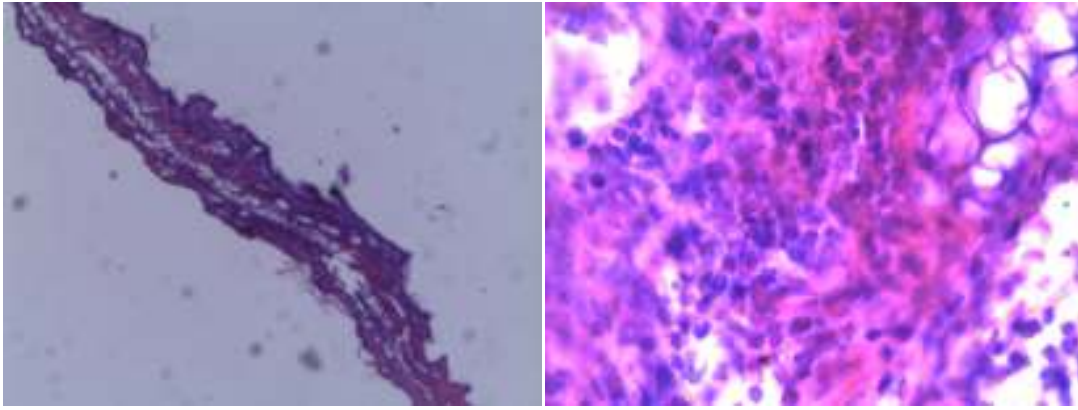


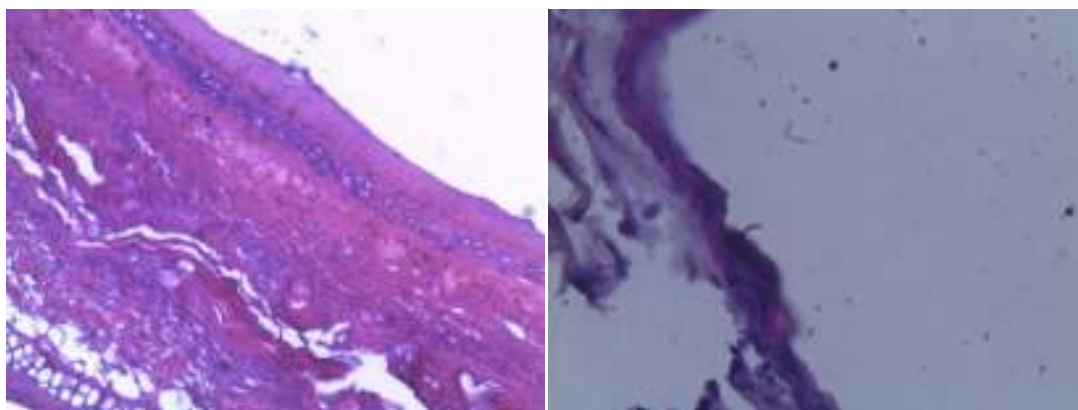
Les différentes étapes de l'étude anatomopathologique



Les coupes histologiques







Chapitre 1

Monographie de la Plante

Thymus vulgaris

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

Chapitre 3

Résultats et Discussion