

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie

MEMOIRE DE MAGISTER

en Biologie

Spécialité : Biotechnologie végétale

EXTRACTION ET CARACTERISATION DE L'HUILE ESSENTIELLE
ET DE QUELQUES METABOLITES SECONDAIRES ACTIFS D'UNE
PLANTE A CARACTERE THERAPEUTIQUE,
Thymus vulgaris L., ET ETUDE DE QUELQUES ACTIVITES
PHARMACOLOGIQUES

Par

MOSTEFA SARI Fouzia

Devant le jury composé de :

M. KHALI	Maître de conférences A, Université de Blida	Président
F. SAIDI	Professeur, Université de Blida	Examineur
A. BERBER	Maître de conférences A, Université de Blida	Examineur
M.S. HAMAIDI	Maître de conférences A, Université de Blida	Rapporteur
H.S. CHERIF	Maître assistante A, Université de Blida	Co-promoteur

Invité :

M. Nemri	Chef service du laboratoire de toxicologie	SAIDAL
----------	--	--------

Blida, Avril 2011

RESUME

Ce présent travail repose sur l'identification, la caractérisation et le dosage de quelques métabolites secondaires actifs extraits de *Thymus vulgaris L.*, ainsi que sur les effets thérapeutiques ou toxiques que peuvent engendrer les extraits de cette plante.

L'étude histologique nous a permis de localiser les sites de sécrétion et de stockage des huiles essentielles qui sont dispersés au niveau de tous les organes de la partie aérienne de la plante.

Les dosages chimiques révèlent la présence de polyphénols (22.01 mg/g), de flavonoïdes (4.356 mg/g), de caroténoïdes (38.24 mg/100 g) et de chlorophylle (Chlorophylle a à raison de 1.5596 mg/g et chlorophylle b à raison de 1.124 mg/g). Nous avons pu également révéler, par screening chimique, la présence d'autres métabolites tel que les mucilages, les anthraquinones libres, les tannins catéchiques et les alcaloïdes.

L'utilisation de techniques fines telle que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CGSM) nous a permis de connaître la composition chimique, respectivement, des fractions non volatiles et volatiles (huile essentielle) de la plante. Selon cette dernière analyse, le *Thymus vulgaris L.* étudié est du chémotype à carvacrol.

L'huile essentielle peut être toxique (DL50 égale à 1.08 g/Kg) et très irritante, mais elle est dotée d'activité antimicrobienne très élevée comparée à l'extrait aqueux. Les deux extraits possèdent une activité anti-inflammatoire, antispasmodique et pyrétogène. L'effet hypotenseur n'a été étudié et démontré que pour l'extrait aqueux. En outre, l'extrait méthanolique de la plante possède un effet antioxydant remarquable.

Mots clés : *Thymus vulgaris L.*; métabolites secondaires; huile essentielle ; extraction ; identification ; toxicité ; effet thérapeutique.

ABSTRACT

These present work concerns the identification, the characterization and dosage of some active secondary metabolites which are extracted from *Thymus vulgaris L.*, in addition to the curative or the toxic effect which can be induced by the plant extracts.

The secretory and storage of essential oils sites has been localised by an histological study ; they are distributed on most of the surface of the plant aerial parts organs.

The chemical analyses detect the presence of phenolic compounds (22.01 mg/g), flavonoids (4.356 mg/g), carotenoids (38.24 mg/100 g) and chlorophyll (chlorophyll A at 1.55 mg/g and chlorophyll B at 1.124 mg/g). Many other chemical substances have been revealed by a chemical screening such as mucilages, free anthraquinones, catechic tannins and alkaloids.

The use of precise techniques, such as the high pressure liquid chromatography (HPLC) and the gas chromatography combined to mass spectrometry (GCMS), enable us to determine the chemical composition of the non volatile and volatile (essential oil) fraction of the plant, respectively. This latter technique shows that the most important compound which determines the chemotype of our plant is the carvacrol.

The essential oil can be toxic (LD50 is evaluated at 1.08 g/Kg) and very irritant, however, it has an antimicrobial activity better than the aqueous extract.

Both of the two extracts can reduce the inflammation and the spasms and increase the body temperature.

The hypotensive activity has been studied and demonstrated only for the aqueous extract. The plant methanolic extract possesses a high antioxidant effect.

Key words : *Thymus vulgaris L.*, secondary metabolites, essential oil, extraction, identification, toxicity, therapeutic effect.

الملخص

تتمحور هذه الدراسة حول تحديد ووصف وقياس تركيز بعض المركبات العضوية الثانوية الفعالة المستخرجة من نبات الزعتر المعروف بإسم *Thymus vulgaris L.* من جهة, و إبراز الخصائص الطبية و التأثيرات السامة لمختلف مستخلصات هذه النبتة من جهة أخرى.

تمكنا عن طريق تحليل الأنسجة النباتية من تعيين المراكز الخاصة بإفراز و إختزان الزيوت الأساسية الطيارة, إذ نجدها منتشرة على سطح مختلف الأعضاء العلوية لهذه النبتة.

فيما يخص التحاليل الكيميائية, فقد أظهرت هذه الأخيرة وجود مركبات متعددة الفينولات (Polyphenols) (22.01 مغ/غ) , الفلافونويد (Flavonoides) (4.356 مغ/غ) , الكاروتينويدات (Carotenoides) (38.24 مغ/100 غ) و المادة اليخضورية (المادة " أ " بتركيز 1.5596 مغ/غ و المادة " ب " بتركيز 1.124 مغ/غ) . كما أنه تم الكشف عن عدة مركبات أخرى بواسطة الإنتقاء الكيميائي, و المتمثلة في المواد الموسيلاجية (Mucilages) , الألكالويدات (Alkaloides) , الدباغ الكاتيشية (Tanins catechiques) و الأنتراكينونات الحرة (Anthraquinones libres) .

بفضل الإستعانة بمختلف التقنيات الدقيقة مثل الكروماتوغرافية السائلة المتطورة (HPLC) و الكروماتوغرافية الغازية المقرونة بطيف الكتلة (CGSM) , إستطعنا التعرف على مختلف المكونات الكيميائية للمستخلصات ذات الطبيعة غير الطيارة (الزيوت الأساسية) على التوالي. و لقد تم التعرف على النوع الكيميائي (Chemotype) للنبتة المدروسة, إذ يمكن تصنيفها ضمن نباتات الزعتر ذات الصفة الكرفاكرولية (à carvacrol) (Thym).

بالنسبة للزيوت الأساسية للزعتر, فيمكن لهذه الأخيرة أن تكون سامة (الجرعة القاتلة لنصف الحيوانات المخبرية تقدر بـ 1.08 غ/كغ) و ذات خاصية مهيجة للجلد, إلا أنها تكتسب قدرة عالية على قتل أو منع إنتشار الجراثيم مقارنة بمفعول المستخلص المائي للنبتة.

أظهرت مختلف التجارب قدرة كلا المستخلصين, المائي منهما و الزيتي, على التخفيف من التقلصات العضلية (antispasmodique) و الإلتهابات (Anti-inflammatoire) و القدرة على رفع حرارة الجسم (Pyrétoène).

لم يتم الكشف و إثبات وجود خاصية تعديل إرتفاع الضغط الدموي إلا بالنسبة لمستخلص الزيوت الأساسية. , كما أنه تم إثبات خاصية المستخلص الميثانولي لهذه النبتة ضد الأوكسدة.

الكلمات المفتاح : *Thymus vulgaris L.* , المركبات العضوية الثانوية, الزيوت الأساسية, إستخراج , وصف , التأثيرات السامة , الخصائص الطبية.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail...

A mes parents, pour vos mains qui ont tant travaillées, pour votre coeur qui m'a tant donné, pour votre sourire qui m'a tant réchauffé, pour vos yeux qui furent parfois mouillés, pour vous qui m'avez tant aimé. Je remercie tout particulièrement ma mère qui m'a toujours soutenu dans mes choix, et qui malgré les kilomètres a toujours été présente chaque fois que cela a été nécessaire. Merci Maman, Merci Papa, Merci grand mère, Merci Wahiba, Amel, Toufik, Sidali, Sidahmed, Mohamed.

A ma fille qui a toujours été ma source de courage et de volonté et d'espoir. C'est grâce à toi que j'ai eu la force de terminer ce travail. Je t'addor ma très chère princesse "melek".

A mes adorables petites Amira, Amani, Loudjayne, Feriel, Faraf et mon adorable prince Amine.

Grâce à cette expatriation j'ai eu la chance d'avoir quelqu'un qui est pour moi comme une famille de coeur. C'est avec vous que j'ai partagé mes joies, mes peines, vous m'avez soutenu grâce à votre présence, à votre aide qui m'a été très précieuse, à votre sagesse, à votre sourire, et à votre amitié, merci Mr. Nemri.

A celui qui m'a tant encouragé, motivé et aidé à réaliser ce travail, A vous Mr. Torqui.

A tous mes enseignants qui ont fournis tant d'effort pour nous.

A toutes mes amies et surtout : Amina, Menel, Theene, Sakina, Soumia, Zahra, Bakhta, Afef, Hassiba, Amina, Fatima Zahra et Lamia.

A tous ceux qui m'ont soutenu ou contribué de loin ou de pré à ce modeste travail, surtout : Lakhdar, Hayet et Amidet.

FOUZIA

REMERCIEMENTS

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à Monsieur HAMADI, Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse, Merci pour votre encadrement sans faille tout au long de ces trois années, merci pour votre gentillesse remarquable.

Madame CHERIF, Je tiens tellement à vous remercier pour tous les encouragements, les précieux conseils, la confiance que vous m'avez accordé, et surtout le temps que vous m'avez consacré malgré toutes vos occupations.

Monsieur NEMRI, qu'il fut agréable et motivant d'avancer dans ce long et périlleux travail de thèse mais tellement enrichissant et stimulant avec toute sa bienveillance, sa confiance, tout son encadrement scientifique, sa disponibilité, et son savoir.

A vous Mme SAIDI, j'adresse mes profonds remerciements pour avoir accepté de m'aider à améliorer ce travail et pour tous les conseils que vous m'avez donnés. Un grand merci.

Je remercie vivement Mr RAALI pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie du jury de cette thèse. J'adresse mes profonds remerciements à Mr BERBER pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de mon jury de thèse. Consciente de vos nombreuses responsabilités, je suis particulièrement touchée du temps que vous m'avez accordé. C'est un très grand honneur et un très grand plaisir de pouvoir aujourd'hui vous soumettre mes travaux de recherche sur ce sujet.

Monsieur KERMOUA, vous avec qui j'ai tant de fois eu de longues et enrichissantes discussions, c'est une grande joie de vous compter parmi les invités d'honneur. Je vous adresse mes plus chaleureux remerciements.

A vous monsieur BOURAHMONE, j'adresse mes sincères remerciements pour m'avoir bien reçu au sein de votre laboratoire et fournis tous le nécessaire pour la réalisation de ce travail. Merci pour votre présence et soutien.

Je ne voudrai surtout pas omettre de remercier Mr. MOKBELI directeur de l'institut des sciences de la nature et de la terre et Mr. BEAUBED directeur du CIRIM, Mr. BENMOKADEM, Mr. KARAHACENE, Mr RANEM, Mme FILALI et Melle CHAABANE et tout le personnel du CIRIM.

Mes remerciements vont à tout le personnel du complexe antibiotical Sidal de Média et en particulier Mr Achti, Mr. Medjedji, Mr. Ketabi, Melles Imene, Souad, Nacera et Siham et le personnel des laboratoires de pharmacotoxicologie, stérilité, microbiologie et physicochimie.

A tout le personnel administratif et des laboratoires du département de biologie, surtout le laboratoire de biotechnologie. Sans oublier Mme Benbrik et le personnel des laboratoires de l'Institut d'Agronomie.

A vous monsieur Slimane HAMDI et Mr. DJAFER j'adresse ma gratitude et mes profonds remerciements pour votre aide et soutien et encouragements. Soyez assuré de ma plus entière reconnaissance.

A ma très chère sœur wahiba, mille fois merci.

A mes amis et ceux qui m'ont soutenu de près et de loin, merci.

FOUZIA

TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Les plantes aromatiques et médicinales	21
1.2. Le Thym	27
1.3. Les huiles essentielles	31
1.4. Les procédés d'extraction des huiles essentielles	42
1.5. L'activité biologique des huiles essentielles	49

2. EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSES

2.1. MATERIELS D'ETUDE	52
------------------------	----

2.2. METHODES D'ETUDE	55
-----------------------	----

2.2.1. IDENTIFICATION BOTANIQUE DE LA PLANTE	55
--	----

2.2.2. DETERMINATION DU POURCENTAGE DES MINERAUX	59
--	----

2.2.3. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE <i>THYMUS VULGARIS</i> L.	59
---	----

2.2.3.1. Screening chimiques de certains métabolites secondaires de <i>Thymus vulgaris</i> L.	59
---	----

2.2.3.2. Détermination de la teneur en certains composés chimiques de <i>Thymus vulgaris</i> L.	62
---	----

2.2.3.2.1. Dosage des composés non volatils	62
---	----

2.2.3.2.1. 1. Les techniques de dosages	62
2.2.3.2.1. 2. Dosage spectral des composés phénoliques	63
2.2.3.2.1. 3. Dosage spectral d'autres métabolites secondaires	68
➤ Dosage des flavonoïdes	68
➤ Dosage des chlorophylles	69
➤ Dosage des caroténoïdes	70
2.2.3.2.2. Dosage des composés volatiles	72
2.2.3.2.2.1. Extraction et séparation des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> L.	72
2.2.3.2.2.2. Etude cinétique de l'hydrodistillation de <i>Thymus vulgaris</i> L.	73
2.2.3.2.2.3. Les caractéristiques organoleptiques des extraits d'huile essentielle	76
2.2.3.2.2.4. Analyses physicochimiques	76
2.2.3.2.2.5. Etude de la toxicité de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> L.	79
➤ Détermination de la toxicité aigue de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> L. administré par voie orale	79
➤ Evaluation de la tolérance cutanée in vivo	81
2.2. 4. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-MICROBIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE ET DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>THYMUS VULGARIS</i> L.	84
2.2.4. 1. La conservation des souches microbiennes	84
2.2.4. 2. Test d'inhibition des champignons	84
2.2.4. 3. Test d'inhibition des bactéries : Aromatogramme	85
2.2.5. TESTS DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE <i>THYMUS VULGARIS</i> L.	87
2.2.5. 1. Activité antioxydante (Détermination du pouvoir réducteur)	87
2.2.5. 2. Activité hypotensive	88
2.2.5. 3. Effet antipyrétique	93
2.2.5. 4. Recherche des endotoxines bactériennes (Le LAL test)	97
2.2.5. 5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	101
2.2.5. 6. Activité antispasmodique	104
2.2.6. Analyse statistique	107
3. RESULTATS ET DISCUSSION	108

3.1. RESULTATS DE L'ETUDE BOTANIQUE DE LA PLANTE	108
3.2. DETERMINATION DU POURCENTAGE DES MINERAUX	117
3.3. RESULTATS DE L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE <i>THYMUS VULGARIS</i> L.	117
3.4. L'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE ET DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>THYMUS VULGARIS</i> L.	142
3.5. RESULTATS DES TESTS DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE <i>THYMUS VULGARIS</i> L.	162
CONCLUSION	
APPENDICE	
GLOSSAIRE	
REFERENCES	

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Distribution du genre <i>Thymus</i> dans le monde. La ligne pointillée représente toutes les sections sauf la section <i>Serpyllum</i> et section <i>Hyphodromi</i> sous-section <i>Serpyllastrum</i>	30
Figure 1.2	Vue d'ensemble d'un pied de <i>Thymus vulgaris</i> L.	31
Figure 1.3	Sommités fleuries de <i>Thymus vulgaris</i> L.	31
Figure 1.4	Disposition des feuilles et des inflorescences au niveau des nœuds de la tige	31
Figure 1.5	Anatomie d'un trichome glandulaire de <i>Thymus vulgaris</i> L.	33
Figure 1.6	Glande sécrétrice sessile sur la face inférieure de la feuille remplie d'huile (x 420)	33
Figure 1.7	Trichome glandulaire avec tête unicellulaire sur la face supérieure de la feuille d'Origan (x 420)	33
Figure 1.8	Structure de squalène	35
Figure 1.9	Structure du β -carotène et du lycopène	35
Figure 1.10	Les composés aromatiques des huiles essentielles	36
Figure 1.11	Les principales composantes de l'huile essentielle du genre <i>Thymus</i> classées par ordre d'importance	41
Figure 2.1	Plante entière fraîche de <i>Thymus vulgaris</i> L.	52
Figure 2.2	Feuilles séchées de <i>Thymus vulgaris</i> L.	52
Figure 2.3	Souris albinos souche NMRI (Naval Medical Research Institute)	53
Figure 2.4	Rat Wistar Albinos	54
Figure 2.5	Lapin hybride entre le Neozelandais souche 1066 SOLAM et le Carlifonien souche SOLAF (Selection faite par l'INRAA de Toulouse, France)	54
Figure 2.6	Chat, femelle non gestante	54
Figure 2.7	Niveaux des prélèvements de la racine et de la tige	57
Figure 2.8	Niveau des coupes de la feuille	57

Figure 2.9	Niveau de la coupe du fruit	57
Figure 2.10	Technique de la double coloration	58
Figure 2.11	Protocole d'extraction des polyphénols totaux	64
Figure 2.12	Protocole de dosage des composés phénoliques totaux	65
Figure 2.13	Schéma illustrant la préparation des échantillons pour l'analyse par HPLC	66
Figure 2.14	Chromatogramme de l'HPLC des standards externes (UV 330 nm)	67
Figure 2.15	Protocole de dosage des flavonoïdes	68
Figure 2.16	Protocole d'extraction et de dosage des chlorophylles	69
Figure 2.17	Protocole d'extraction et de dosage des caroténoïdes	71
Figure 2.18	Appareil pour l'extraction des huiles essentielles, dimensions en millimètres	73
Figure 2.19	Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri	87
Figure 2.20	Protocole de détermination du pouvoir réducteur	88
Figure 2.21	Les étapes de la détermination de la sensibilité de l'animal à l'histamine	92
Figure 2.22	Schéma réactionnel de la formation du gel	98
Figure 2.23	Recherche d'endotoxine dans les extraits végétaux par le LAL test en présence de témoins positif et négatif	100
Figure 2.24	Réaction positive du LAL test	100
Figure 2.25	Réaction négative du LAL test	100
Figure 3.1	Diagramme florale de la fleur de <i>T.vulgaris</i> . Formule florale : 5 S + 5 P + 4 E + 2 C	108
Figure 3.2	Fleur hermaphrodite zygomorphe	108
Figure 3.3	Calice à sépales, ciliés et dentés, soudés (gamosépale) vue à la loupe binoculaire au grossissement G x 2.5	109
Figure 3.4	Corolle tubuleuse (A) bilabée à 5 pétales soudés (gamopétale): 3 pétales soudés à la base (a) et 2 totalement soudés (b) (B), vue à la loupe G x 2.5	109

Figure 3.5	Trichomes et poils tecteurs au niveau d'un pétale de <i>T. vulgaris</i> . Vue au microscope G x 40 (A) et à la loupe G x 4	110
Figure 3.6	Androcé dialystémone avec étamines soudées à la corolle, vue à la loupe G x 4	110
Figure 3.7	Anthère médifixe à 2 sacs polliniques, vue à la loupe G x 4	110
Figure 3.8	Grains de pollen vus au microscope grossissement G x 40 (A) et G x 10 (B)	111
Figure 3.9	Carpelle à stigmate bifid Vue à la loupe au G x 4 (a) et Au microscope photonique au grossissement G x 40 (b et c)	111
Figure 3.10	Fruit constitué de quatre akènes (Tetrakène) qui sont fixés au calice	112
Figure 3.11	Tige hérissée (recouverte de poils épidermiques à disposition alélotriche)	113
Figure 3.12	Coupe transversale au niveau de la tige	113
Figure 3.13	Coupe transversale d'une tige de <i>T. vulgaris</i> L.	114
Figure 3.14	Tige à section polygonale	114
Figure 3.15	Disposition des tissus dans la tige	115
Figure 3.16	Coupes transversale (A) et longitudinale (B) au niveau de la feuille de <i>T. vulgaris</i> L.	116
Figure 3.17	Epiderme foliaire vue d'en face au microscope au grossissement G x 40	116
Figure 3.18	Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux	119
Figure 3.19	Chromatogramme de l'HPLC de <i>T.vulgaris</i> avant hydrolyse	121
Figure 3.20	Chromatogramme de l'HPLC de <i>T.vulgaris</i> après hydrolyse	122
Figure 3.21	Courbe d'étalonnage des caroténoïdes	125
Figure 3.22	Evolution du rendement en huiles essentielles en fonction de la température d'extraction par hydrodistillation de <i>Thymus vulgaris</i> L.	127

Figure 3.23	Evolution du rendement en huiles essentielles en fonction de la masse de la matière végétale au cours de l'hydrodistillation de <i>Thymus vulgaris</i> L.	128
Figure 3.24	Evolution du rendement en huiles essentielles en fonction de l'hydromodule utilisé pour l'hydrodistillation de <i>Thymus vulgaris</i>	129
Figure 3.25	Evolution du rendement en huiles essentielles en fonction du temps d'extraction par hydrodistillation de <i>Thymus vulgaris</i>	130
Figure 3.26	Evolution du rendement en huiles essentielles en fonction de la période de récolte de <i>Thymus vulgaris</i>	131
Figure 3. 27	Profil chromatographique de la fraction d'huile essentielle de <i>T.vulgaris</i> obtenue après 30 minutes d'hydrodistillation	135
Figure 3.28	Profil chromatographique de l'huile essentielle extraite pendant trois heures de la plante récoltée durant le mois de Novembre	137
Figure 3.29	Profil chromatographique de la fraction d'huile Essentielle de <i>T.vulgaris</i> obtenue après trois heures d'hydrodistillation	139
Figure 3.30	Influence de l'Ether diéthylique sur la croissance de <i>Nectria galligena</i>	143
Figure 3.31	Influence de Tween 80 sur la croissance de <i>Nectria galligena</i>	144
Figure 3.32	Influence de l'Ether diéthylique sur la croissance de <i>Monilia fructigena</i>	145
Figure 3.33	Influence de Tween20 sur la croissance de <i>Monilia fructigena</i>	145
Figure 3.34	Influence de l'Ether diéthylique sur la croissance de <i>Venturia inaequalis</i>	146
Figure 3.35	Influence de Tween20 sur la croissance de <i>Venturia inaequalis</i>	147
Figure 3.36	Influence de l'Ether diéthylique sur la croissance de <i>Peronospora graminiae</i> (Isolat 35 BMS 1)	148

Figure 3.37	Influence de Tween20 sur la croissance de <i>Peronospora gramineae</i> (Isolat 35 BMS 1)	148
Figure 3.38	Influence de l'Ether diéthylique sur la croissance de <i>Peronospora gramineae</i> (Isolat 16 OUS R3)	149
Figure 3.39	Influence de Tween20 sur la croissance de <i>Peronospora gramineae</i> (Isolat 16 OUS R3)	149
Figure 3.40	Evolution de la croissance mycélienne de <i>Monilia fructigena</i> en fonction du temps et du traitement	151
Figure 3.41	Evolution de la croissance mycélienne de <i>Nectria galligena</i> en fonction des jours	152
Figure 3.42	Evolution de la croissance mycélienne de <i>Venturia inaequalis</i> en fonction des jours	153
Figure 3.43	Evolution de la croissance mycélienne de <i>Peronospora graminea</i> (Isolat 35 BMS 1) en fonction des jours	154
Figure 3.44	Evolution de la croissance mycélienne de <i>Peronospora graminea</i> (Isolat 16 OUS R3) en fonction des jours	155
Figure 3.45	Zones d'inhibition crée par l'action de l'extrait aqueux	157
Figure 3.46	Zones d'inhibition crée par l'action de l'huile essentielle	157
Figure 3.47	Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques à différentes Concentrations	162
Figure 3.48	Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> et des témoins	163
Figure 3.49	Pouvoir réducteur des antioxydants de synthèse	164
Figure 3.50	Mesure du pouls du chat	165
Figure 3.51	Tests de validation de l'action hypotensive de l'histamine (Tensions artérielles de l'animal en fonction des doses croissantes d'histamine injectées)	166
Figure 3.52	Tentions artérielles relatives aux différentes doses d'extraits aqueux injectées	167
Figure 3.53	Evaluation de l'effet hypotensif (Chute de tension artérielle) de l'extrait aqueux de <i>Thymus vulgaris</i> L.	168
Figure 3.54	Variation de la température en fonction du produit administré	170

Figure 3.55	Evolution du pourcentage de l'œdème des pattes (pourcentage de l'inflammation) en fonction du temps et du traitement	176
Figure 3.56	Effet de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris L.</i> sur l'évolution du pourcentage de l'œdème des pattes (pourcentage de l'inflammation) en fonction du temps	176
Figure 3.57	Effet de l'extrait aqueux de <i>Thymus vulgaris L.</i> sur l'évolution du pourcentage de l'œdème des pattes (pourcentage de l'inflammation) en fonction du temps	177
Figure 3.58	Evaluation de l'effet antiinflammatoire (réduction de l'œdème) des extraits végétaux (EA et HE) de <i>Thymus vulgaris L.</i>	178
Figure 3.59	Droite de régression correspondant à la corrélation entre le pourcentage de l'œdème et le temps (Huile essentielle)	184
Figure 3.60	Droite de régression correspondant à la corrélation entre le pourcentage de l'œdème et le temps (Extrait aqueux)	184
Figure 3.61	Effet réducteur de spasmes des extraits végétaux (Huile essentielle et extrait aqueux) de <i>Thymus vulgaris L.</i>	185
Tableau 1.1	Les composés terpéniques	35
Tableau 2.1	Les souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne	55
Tableau 2.2	Les temps de rétention (Rt) des différents standards	68
Tableau 2.3	Classes de toxicité : échelle de Hodge et Sterner	81
Tableau 2.4	Classification des érythèmes et des œdèmes (Echelle de DRAIZE : échelle de lecture)	83
Tableau 2.5	Distribution des lots de lapins selon le produit administré et la dose	96

Tableau 2.6	La répartition des lots pour le test de l'activité antiinflammatoire	103
Tableau 2.7	Répartition des lots pour le test de l'activité antispasmodique	106
Tableau 3.1	Métabolites secondaires détectés dans les feuilles de <i>Thymus vulgaris</i> L.	118
Tableau 3.2	Concentration des composés phénoliques détectés avant et après hydrolyse acide exprimées en mg/ 100g de matière végétale sèche	122
Tableau 3.3	Caractérisation organoleptiques et physico-chimique des extraits bruts	132
Tableau 3.4	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>T.vulgaris</i> récoltée durant le mois de mai extraite par hydrodistillation pendant 30 minutes (Echantillon 1)	134
Tableau 3.5	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>T.vulgaris</i> récoltée durant le mois de novembre extraite par hydrodistillation pendant 3 heures (Echantillon 3)	136
Tableau 3.6	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>T.vulgaris</i> récoltée durant le mois de mai extraite par hydrodistillation pendant 3 heures (Echantillon 2)	138
Tableau 3.7	Relation entre le taux de mortalité et la dose d'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> L.	140
Tableau 3.8	Calcul de l'indice d'irritation primaire cutané (IP)	141
Tableau 3.9	Classification des produits en fonction de leur Indice d'irritation primaire cutanée (IP)	142
Tableau 3.10	Influence des solvants sur La croissance de <i>Necteria galligena</i> (Diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)	143
Tableau 3.11	Influence des solvants sur La croissance de <i>Monilia fructigena</i> (Diamètres des colonies mycéliennes exprimé en centimètre)	144

Tableau 3.12	Influence de solvants sur La croissance de <i>Venturia inaequalis</i> (Diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)	146
Tableau 3.13	Influence de solvants sur La croissance de <i>Peronospora graminea</i> (Isolat 35 BMS 1) (Diamètres des colonies mycéliennes exprimé en centimètre)	147
Tableau 3.14	Influence de solvants sur La croissance de <i>Peronospora graminea</i> (Isolat 16 OUS R3) (Diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)	149
Tableau 3.15	Influence de l'H.E de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Monilia fructigena</i> (Les diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)	150
Tableau 3.16	Evaluation de l'effet de l'H.E de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Nectria galligena</i> (Les diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)	151
Tableau 3.17	Influence de l'H.E de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Venturia inaequalis</i> (Les diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)	152
Tableau 3.18	Influence de l'H.E de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Peronospora graminea</i> (Isolat 35 BMS 1) (Les diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)	153
Tableau 3.19	Influence de l'H.E de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance de <i>Peronospora graminea</i> (Isolat 16 OUS R3) (Les diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)	154
Tableau 3.20	Mesure de l'inhibition de la croissance de <i>Candida albicans</i> par l'extrait aqueux de <i>Thymus vulgaris</i> L.	156
Tableau 3.21	Mesure de l'inhibition de la croissance de <i>Candida albicans</i> par l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> L.	156
Tableau 3.22	Détermination de la sensibilité des souches bactériennes aux huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> (Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en millimètre)	159

Tableau 3.23	Les concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	160
Tableau 3.24	Détermination de la sensibilité des souches bactériennes aux extraits aqueux de <i>Thymus vulgaris</i> (Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en millimètre)	160
Tableau 3.25	Effet des différentes concentrations de l'extrait aqueux de <i>Thymus vulgaris</i> sur la tension artérielle du Chat (Les injections des extraits aqueux sont intercalées par des injections d'histamine 0.1 γ)	167
Tableau 3.26	Résultats des températures des lapins en fonction du produit Administré	169
Tableau 3.27	Analyse de variances de la première variable (Température initiale)	171
Tableau 3.28	Analyse de variances de la deuxième variable (Variations de la température)	172
Tableau 3.29	Résultat du test de NEWMAN et KEULS (Activité antipyrétique)	173
Tableau 3.30	Evolution du pourcentage moyen de l'œdème des pattes (Pourcentage de l'inflammation)	175
Tableau 3.31	Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux de <i>Thymus vulgaris L.</i>	177
Tableau 3.32	Analyse de variances (Activité anti-inflammatoire Des extraits végétaux)	180
Tableau 3.33	Résultat du test de NEWMAN et KEULS pour le facteur 1 (PDMA)	181
Tableau 3.34	Résultat du test de NEWMAN et KEULS pour le facteur 2 (Temps)	182
Tableau 3.35	Matrice de corrélations partielles (Activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux)	183
Tableau 3.36	Matrice de corrélations partielles (Activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle)	183

INTRODUCTION

Depuis la période préhistorique, les plantes ont été à la base de plusieurs thérapies. Les médecins et les pharmaciens prescrivaient ou vendaient environ 90 % de produits à base de plantes [130].

Cependant, à partir des années 1990, la mise au point de médicaments à base de substances naturelles a été pratiquement éliminée par la plupart des laboratoires pharmaceutiques. Ceci est principalement dû aux domaines émergeant de la chimie combinatoire; des bibliothèques par lesquelles d'énormes petites molécules artificielles pourraient être rapidement synthétisées et évaluées comme des candidats de médicament [65]. C'est à partir de cette période que les médicaments chimiques conçus en laboratoire se sont imposés [130]. Selon CARAFFA et al. (1999), plus de 10.000 espèces de plantes différentes sont utilisées à des fins thérapeutiques.

La préservation et la valorisation des ressources naturelles à intérêt médicinale et aromatique sont devenues des domaines très importants sur le plan économique [252].

L'Algérie, de part son climat et ses terrains fertiles, possède une flore très riche et offre des conditions de développement de nouvelles exploitations agricoles des plantes médicinales et aromatiques [22].

Les métabolites secondaires restent l'objet de nombreuses recherches in vivo et in vitro, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes et les huiles essentielles auxquels on attribue de nombreux effets thérapeutiques [98].

Les études pharmacologiques sont particulièrement importantes pour évaluer les effets des extraits de plantes aromatiques (les huiles essentielles, les extraits méthanoliques et autres) sur l'organisme humain [252].

Dans le cadre de la valorisation des espèces végétales algériennes, et compte tenu des vertus thérapeutiques que présentent les Lamiacées, nous nous sommes intéressés à l'extraction des huiles essentielles de « *Thymus vulgaris L.* » provenant de la région de Beni Rached située à Chlef.

Notre choix s'est porté sur cette plante aromatique spontanée, car elle est très répandue en Algérie à l'état sauvage et largement utilisée en médecine traditionnelle.

Cette étude comporte deux parties :

Une partie théorique relative aux huiles essentielles, à leur extraction, aux caractères botaniques de la plante étudiée, ainsi qu'aux travaux antérieurs sur cette plante.

Une partie expérimentale qui comporte plusieurs volets tels que :

- L'étude de l'influence des paramètres opératoires sur le rendement en huiles essentielles.
- La détermination de la période de récolte donnant un meilleur rendement à l'extraction.
- Evaluer par les études analytiques, la qualité des composés volatils de la plante (huiles essentielles) en mesurant leurs propriétés organoleptiques et physico-chimiques .
- L'extraction, l'identification et le dosage de certains métabolites secondaires.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits d'huiles essentielles et aqueux sur des bactéries à intérêt médical et sur des champignons phytopathogènes.
- Etude pharmaco- toxicologique de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux de la plante.

CHAPITRE 1

GENERALITES

1.1. Les plantes aromatiques et médicinales

1.1.1. Définitions

1.1.1.1. Les plantes médicinales

On appelle plante médicinale un végétal dont un (ou plusieurs) organe possède des activités pharmacologiques de nature à permettre son emploi en thérapeutique [33].

Les plantes médicinales ou pharmaceutiques interviennent dans la préparation des médicaments. En médecine, les remèdes tirés des plantes portent le nom de préparation galénique (du nom de Galien, médecin du premier siècle) [206].

1.1.1.2. Les plantes aromatiques

Les plantes aromatiques sont constituées par des organes apportant une odeur et une saveur destinées à améliorer un bien-être lors de la dégustation. Il peut s'agir soit d'une plante entière ou d'un organe particulier (feuilles, fleurs, fruits, bourgeons, graines, rhizomes ou bulbes) [252].

1.1.1.3. Pharmacognosie

On désigne sous le terme de pharmacognosie (du grec pharmakon, poison ou médicament, et gnose, science), la science qui étudie les substances d'origine naturelle, biologiquement actives servant à préparer des médicaments. Son objectif principal est la recherche de nouvelles substances naturelles à visées thérapeutiques ou de nouvelles sources de substances naturelles déjà connues (à partir des plantes ou d'autres sources biologiques telles que les organes animaux), elle vise également à découvrir de nouvelles plantes médicinales, les récolter et les cultiver [38].

1.1.1.4. La phytothérapie

La phytothérapie est le traitement des pathologies par les plantes médicinales ; celles-ci sont consommées en l'état (tisanes) ou après une simple transformation (poudre, extrait, teinture) [219].

1.1.1.5. L'aromathérapie

Le terme Aroma en grecque signifie parfum [228]. L'aromathérapie constitue les méthodes mettant à profit l'activité des huiles essentielles en prescrivant l'emploi, à des fins thérapeutiques, de leurs composés volatils pour soigner, atténuer, ou prévenir des maladies [228;33;122;263].

1.1.2. Les principales substances actives de la plante

De très nombreuses substances végétales exercent une action médicinale.

1.1.2.1. Les phénols

Ce sont des substances qui possèdent un cycle aromatique portant une fonction hydroxyl (phénol) ou plus (polyphénol) [69]. Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides [244;266]. On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages [130].

1.1.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc [178] [9]. Environ 2 % de tous les composés carbonés produits par les plantes par photosynthèse sont convertis en flavonoïdes ou des composés apparentés [69].

1.1.2.3. Les tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques, hydrosolubles, ayant la propriété de contracter les tissus, d'où leur emploi pour tanner les peaux, c'est-à-dire les rendre imputrescible. Cette propriété est liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines, polysaccharides...) [9;178].

Il existe des tannins galliques (dont le motif structural de base est l'acide gallique) et des tannins catéchiques (oligomères et polymères d'aglycones polyphénoliques) [266;178].

Tous les organes végétaux peuvent en renfermer (racines, écorces, feuilles..), mais on note une accumulation dans les organes âgés (écorces) [178]. Ils donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles [130]. Ils se trouvent dans le cytoplasme de la cellule végétale, ou concentrés dans des poches spéciales, les vacuoles à tannin [76]. Ils permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, et réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure [130].

1.1.2.4. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe chimique, contenant de l'azote (N) et qui sont biologiquement actifs [178].

Ils paraissent jouer un rôle défensif chez la plante contre les herbivores et les pathogènes. En raison de leur activité biologique puissante, beaucoup d'entre eux ont été exploités comme des produits pharmaceutiques, des stimulants, des narcotiques et des poisons [63;266]. Certains sont des médicaments connus ayant des vertus thérapeutiques avérées telle que l'atropine, présente dans la belladone (*Atropa belladonna*), qui a une action directe sur le corps : activité sédatrice, effets sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) [130].

1.1.2.5. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles comptent parmi les plus importants des principes actifs des plantes. Ce sont des composés oxygénés, parfois d'origine terpénoïde et possédant un noyau aromatique. Elles sont emmagasinées dans des cellules spéciales. La proportion de ces substances dans la plante dépend de l'âge de celle-ci, de la saison, du climat, etc [130].

1.1.2.6. Les saponosides (ou saponines)

Les saponosides, dont le nom dérive du mot savon [266; 9], sont des hétérosides à génine stéroïdique ou triterpénique, caractérisés principalement par leurs propriétés tensioactives. Ces propriétés se traduisent par la formation de

mousse par agitation dans l'eau. De plus, la plupart des saponosides présentent des propriétés hémolytiques [102; 266; 9].

1.1.2.7. Les substances minérales

Les plantes puisent les minéraux du sol et les transforment en composés aisément assimilable par l'organisme. Dans de nombreux cas, les minéraux contenus dans une plante, que celle-ci soit utilisée sous forme de salade, comme le chou vert (*Brassica oleracea*), ou sous forme de compléments nutritionnels, comme le fucus (*Fucus vesiculosus*), participent activement à son activité thérapeutique dans l'organisme [130].

1.1.2.8. Les acides organiques

Leur rôle est de maintenir à l'intérieur de la cellule végétale une pression osmotique semblable à celle de l'extérieur. Ils règlent la diffusion de l'eau à travers les parois de la cellule. Les plus connus sont les acides maliques, citriques, oxaliques et tartriques [132].

1.1.2.9. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments végétaux hydrosolubles de couleur rouge, violette ou bleue. [9; 102]. Ils sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines (dérivés polyphénoliques) [130].

Ils sont responsables des couleurs rouges, bleues et pourpres (violette) des fruits, des légumes, des fleurs et d'autres tissus végétaux. Ils sont particulièrement abondants dans les baies et d'autres fruits [69].

1.1.2.10. Terpénoïdes

Ce sont des composés avec des structures moléculaires contenant un ou plusieurs motifs carboniques de base qui est l'isoprène [230; 266]. Ils peuvent comporter parfois plus de 20 motifs [170].

Ce sont des lipides synthétisés à partir de l'acétyl CoA, par la voie du mévalonate. On en connaît environ 20.000 [170].

1.1.2.11. Les vitamines

Bien qu'elles soient souvent négligées, de nombreuses plantes médicinales sont particulièrement riches en vitamines. Le citronnier notamment (*Citrus limon*) contient des doses élevées de vitamine C et la carotte (*Daucus carota*) est riche en bêta-carotène (pro vitamine A) [130].

1.1.2.12. Les glucosides

Un glucoside est constitué de deux composantes, une partie aglycone et une partie de sucre. La partie aglycone peut être différents types de métabolites secondaires tel que les coumarines, flavonoides, hydroxyanthracene. Les glucosides jouent un grand rôle dans le stockage des réserves nutritives et de défense de la plante. Le cyanure glycosides, (par exemple amygdalin de l'abricot) sort le cyanure hydrogène toxique quand les cellules sont endommagées et agissent comme un système de défense [19].

Les glucosides cardiaques comme la digitoxine, ont une action directe et puissante sur le cœur ; Ils l'aident à maintenir le rythme cardiaque en cas d'affaiblissement [130].

1.1.2.13. Les pigments végétaux

Ces substances, particulièrement importantes pour la vie de la plante, sont divisées en deux groupes :

- Les pigments lipochromes : ce sont des substances grasses formées dans les plastes. A ce groupe appartiennent les pigments indispensables à la photosynthèse : chlorophylle, carotène et xanthophylle.
- Les pigments hydrochromes : ils sont solubles dans l'eau et se trouvent en solution dans le cytoplasme au niveau des vacuoles. Les anthocyanes donnent leur couleur à certaines fleurs (bleuet, pied-d'alouette...) et feuilles, et à certains fruits (cerise, myrtille...). Les pigments exercent des effets médicaux très variés. La chlorophylle possède, entre autre, des propriétés antibactériennes et le carotène se transforme dans le corps humain en vitamine A [76].

1.1.2.14. Les graisses et les huiles

Elles servent de matière de construction et de réserve à la plante. Dans le règne animal on trouve surtout des graisses solides : exp, Graisse de beurre.

Chez les plantes, au contraire, on rencontre surtout des huiles : exp, Huile d'olive, on compte encore les cires qui forment une couche mince à l'extérieur des feuilles, fruits, branches et racines. Protégeant ainsi la plante contre le dessèchement et la pénétration de l'eau [102].

1.1.3. La cueillette ou récolte des plantes médicinales

Le choix de l'époque de la récolte dépend de la nature de l'organe récolté et des variations du taux des principes actifs en fonction de la période de végétation. La composition chimique d'une plante varie avec son cycle végétatif. Ces variations peuvent être quantitatives (la teneur en principe actif passe par un maximum et décroît ensuite), ou qualitatives (apparition d'un principe actif et disparition d'un autre au cours du développement) [102].

Les plantes médicinales doivent être cueillies lorsque la teneur en matière active est la plus forte. La cueillette se fait en début de matinée après le lever du soleil; c'est-à-dire; par temps sec après avoir attendu l'évaporation de la rosée [102].

On ne doit cueillir que les plantes arrivées au stade adulte, c'est-à-dire une fois qu'elles ont fleuri.

On récolte les feuilles quand elles sont jeunes, mais totalement développées au plus tard juste avant que les fleurs ne s'épanouissent.

La cueillette des fleurs se fait juste avant l'épanouissement complet ; et les fruits doivent être cueillis bien mûrs, quant aux bourgeons ils se cueillent au printemps.

La récolte de l'écorce se fait lorsque l'écorce acquiert une certaine épaisseur et se sépare facilement du corps : les écorces d'arbre se récoltent en hiver, celle des arbrisseaux en automne et celles des résineux au printemps.

On déterre les racines quand elles sont assez robustes et complètement développées, (il en va de même pour les rhizomes), et d'une façon générale on récolte au printemps les racines des plantes vivaces et en automne celles des espèces annuelles ou bisannuelles [76; 266].

1.1.4. Séchage et conservation

Du fait que les huiles essentielles s'évaporent facilement, les plantes doivent être séchées à température pas trop élevée et jamais au soleil puis conservées dans des récipients bien fermés [130].

Le maximum de température admise pour le séchage des plantes aromatiques ou les plantes qui contiennent des huiles essentielles est 30 °C. Il est essentiel d'établir une bonne circulation d'air pour éviter les fermentations ou les pourrissements, afin d'obtenir un séchage rapide. Etaler les végétaux (feuilles, fleurs, semences ou graines) en lits minces sur les claies de bois très propres et sans odeur ou sur les papiers [76].

Pour conserver les plantes, il faut vérifier qu'elles sont parfaitement séchées avant de les stocker. Elles doivent être placées dans des récipients secs, ou des sacs de papier, des boîtes en fer blanc ou des caisses. L'utilisation de boîtes ou de sacs en plastiques ordinaires, comme le polyéthylène ; pour le stockage des plantes entraînerai une diminution de leur efficacité. De plus, ces matières peuvent laisser les HE se volatiliser vers l'extérieur [253; 266].

Les plantes doivent être conservées à l'abri de certains agents pouvant entraîner leur altération, et protégées contre l'air, l'humidité, la lumière, les champignons et les insectes [102]. L'action médicale s'affaiblit lorsque les plantes sont conservées trop longtemps [130].

1.2. Le Thym

1.2.1. Habitat

Cette plante spontanée pousse abondamment dans les lieux arides, caillouteux et ensoleillés, des bords de la mer à la montagne [41].

1.2. 2. Ses principaux constituants

La plante séchée contient environ 1 – 2.5 % d'huile essentielle formée en sa majorité de composés terpéniques tel que les monoterpènes phénoliques (Thymol et Carvacrol) à l'origine de la forte odeur du Thym [192]. D'autres composés peuvent constituer la partie volatile du Thym tel que les alcools (linalool et borneol) [76], le camphor, le myrcène, et les sesquiterpènes (β - caryophyllène) [192].

Les composantes non volatiles peuvent être des Tannins (Acide cafeique, Acide rosmarinique) [71], des polysaccharides, des flavonoides, présentes souvent sous leur forme aglycone : les flavones (Apigenine et luteolin), les methyl flavones (Thymonin et diosmetin), dihydro-flavonols (Taxifolin), flavonones (Naringenine), flavonols (Kaempferol et quercetine), et des flavones glycosides (Apigenine-7- β -D-Glucoside, hesperidine) [262; 176; 238].

1.2. 3. La période de récolte

Le thym est cueilli en été [76].

1. 2. 4. Description Botanique

On distingue deux groupes de Thym : Les petites plantes touffues, au-dessous de 50 cm et les formes rampantes parfois avec des brindilles s'enracinant [238; 202].

Le Thym est une plante vivace à tige hérissée, dressée, souvent rougeâtre de 20 à 80 cm de haut [76]. Elles sont quadrangulaires, caractéristique des Lamiaceae [265]. Les poils peuvent couvrir les quatre faces de la tige (holotriche) ou seulement deux faces s'alternant dans chaque entre nœud (alelotriche) ou se trouvent seulement sur les quatre côtes des tiges (goniotriche) [238].

Les feuilles, plus au moins contractées, [202] pétiolées à bord peu denté, sont opposées et de grandeurs variables, les inférieures étant plus grandes. [76; 254]. Elles sont fréquemment ciliées aux marges, soit à la marge entière ou seulement à la base ou sur le pétiole. Les trichomes glandulaires sont très importants contenant l'huile essentielle, il en existe deux types : Les glandes pédicellées avec cellules supérieures pleines d'huiles essentielles, et de grandes glandes globuleuses typiques des lamiaceae, [265] avec quelques cellules basales. Les poils tecteurs sont toujours simples, mais rarement unicellulaires [238; 133].

Les fleurs Zygomorphes sont petites, bilabiées, souvent tubulaires, déclinant une gamme du blanc au mauve en passant par le rose [265; 41 ; 109]. Elles grandissent en groupes au niveau des nœuds. Les feuilles du nœud d'inflorescence se différencient du reste des feuilles de la plante en forme et en

taille, ils sont appelés bractées [238; 254]. Les fleurs sont groupées en panicules très denses sur les rameaux ce qui constitue un cas unique chez les labiées [76; 202].

Le calice tubuleux est à deux lèvres (cinq dents) [265]. Quand il est sec, il joue un rôle important dans la dispersion des petits fruits, ou nucules, pour cela, sa gorge est formée par une rangée de poils et le vent peut le transporter à une grande distance.

La corolle plus au moins exserte, à deux lèvres, formée par deux lobes supérieurs et trois lobes inférieurs. L'androcée est formé de quatre étamines saillantes plus au moins divergentes, alors que le gynécée est formé de deux carpelles qui sont lisses et formant quatre loges chacune un ovule [238; 133; 202]. L'ovaire est supérieur à placentation axile. Le stigmate est bifide [265]. Les fruits sont des noisettes (quatre noisettes par fleur ou fruit tétrakène), restant longtemps soudés au fond du calice [41; 265].

1.2.5. Les différentes espèces de Thym

D'après QUEZEL et SANTA (1963), les différentes espèces de Thym identifiées en Algérie sont les suivantes : *Thymus fantanesi*, *Thymus capitatus*, *Thymus candidissimus*, *Thymus numidicus*, *Thymus lanceolatus*, *Thymus guyonii*, *Thymus dreatensis*, *Thymus ciliatus*, *Thymus hirtus*, *Thymus comutatus*, *Thymus glandulosus*, *Thymus algériensis*, *Thymus vulgaris*.

1.2.6. La distribution du Thym dans le monde

Il est largement distribué dans le monde (Figure 1.1). La région de la méditerranée peut être décrite comme le centre du genre, principalement la région ouest de la méditerranée.

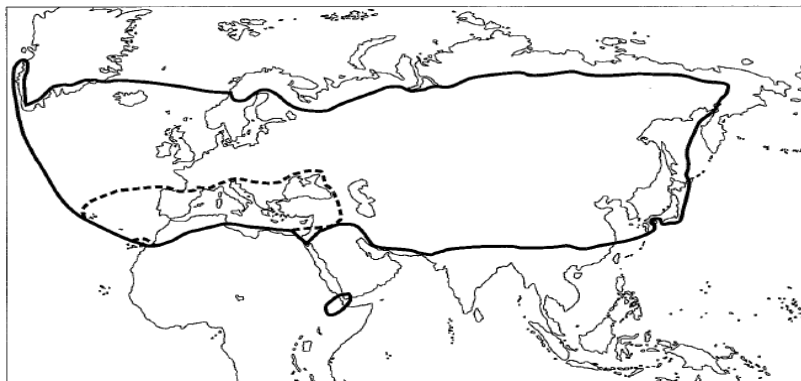


Figure 1.1 : Distribution du genre *Thymus* dans le monde. La ligne pointillée représente toutes les sections sauf la section *Serpyllum* et section *Hyphodromi* sous-section *Serpyllastrum* [238].

1.2.7.1. Usage interne

Les études faites ont révélées qu'il est doté d'action sédatrice, apéritive, antispasmodique, stomachique, carminative expectorante, antiseptique, recommandé en cas de manque d'appétit, d'aérophagie, de bronchite chronique de toux d'irritation, d'asthme, d'absence de règles, diarrhée, digestion difficile, parasites intestinaux, rétention d'urine, rhume, angine, coqueluche., hypotensif, hypocholestérolémiant, antispasmodique, analgésique, antioxydant, anti-inflammatoire [85; 145; 76; 109].

1.2.7.2. Usage externe

Le Thym peut être utilisé dans le traitement des affections de la bouche et des voies respiratoires, chute des cheveux, furoncles et plaies, rhumatismes, arthrite, goutte, action parasiticide, la cellulite [93], cicatrices et dermatoses [85].

1.2.8. Classification de *Thymus vulgaris* L.

La classification adoptée est celle de GUIGNARD et *al.* (2004), et PETER (2004). Les figures 1.2 , 1.3 et 1.4 montrent la plante dans son habitat naturel.

Règne :	Plantae
Embranchement :	Spermatophytes
Sous embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotyledones gamopétales.
Sous classe :	Astéridées.

Ordre :	Euastéridées I
Famille :	Lamiaceae ou Labiées
Sous famille :	Nepetoïdeae
Genre :	Thymus
Espèce :	<i>Thymus vulgaris</i> L.



Figure 1.2 : Vue d'ensemble d'un pied de *Thymus vulgaris* L. (Originale, 2009).



Figure 1.3 : Sommités fleuries de *Thymus vulgaris* L. (Originale, 2009).



Figure 1.4 : Disposition des feuilles et des inflorescences au niveau des nœuds de la tige (Originale, 2009).

1.3. Les huiles essentielles

1.3.1. Définition

Ce sont des produits odorants de composition chimique complexes renfermant des principes actifs volatiles et contenus dans les végétaux. Toutes les parties de la plante peuvent contenir des huiles essentielles dans des vésicules spécialisées [55].

1.3.2. Localisation

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles se fait dans des structures histologiques sécrétrices spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante ou dans les tissus végétaux [39]:

- Des cellules sécrétrices isolées (Cas des Lauraceae ou Zingiberaceae)
- Poils sécréteurs des Lamiaceae.
- Les poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae.
- Les canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae [200].

1.3.2.1. Les cellules sécrétrices

La structure de sécrétion la plus simple est une cellule contenant un liquide de sécrétion qui la distingue des cellules non sécrétrices adjacentes. Ce type cellulaire est observé dans le parenchyme des feuilles de Citronella (*Cymbopogon nardus*), le rhizome du Gingembre (*Zingiber officinale*) [243].

1.3.2.2. Les cavités sécrétrices (ou poches sécrétrices)

Ces cavités sont plus ou moins sphériques et peuvent être formées de deux façons : les cellules parenchymateuses peuvent se séparer les une des autres laissant un espace intercellulaire appelé la lacune ou lumina, ou bien une cellule peut dégénérer créant une cavité dans le tissu. Ces espaces sont liés à des cellules sécrétrices ou à un épithélium qui produit les huiles essentielles. Les cellules, à parois minces, stockent les H.E produites à l'intérieur de leurs plastes. Les fruits et les feuilles des plantes de la famille d'Agrumes sont inclus dans ce groupe (*Citrus aurantifolia*) [243].

1.3.2.3. Les canaux sécréteurs

Ce sont des cavités allongées. Ils sont souvent reliés entre eux créant un réseau s'étendant des racines à la tige, aux feuilles, et aux fleurs fruits. Ils sont composés d'un épiderme qui entoure une cavité centrale. Certaines de ces cellules formant le mur de la cavité changeront en cellules épithéliales sécrétrices. Les huiles sont synthétisées dans leur leucoplastes puis transportés à travers le réticulum endoplasmique dans la cavité. Ces cavités se rejoignent pour former des canaux, lesquels peuvent être rencontrés chez le Cumin (*Cuminum cyminum*) de la famille des Ombellifères [243].

1.3.2.4. Les poils sécréteurs

Ce sont des élongations des cellules épidermiques pour donner des poils dont les cellules terminales sécrètent des essences. Leur forme est variable et caractéristique d'une famille [237].

1.3.2.5. Les trichomes Glandulaires

Ce sont des poils épidermiques pluricellulaires et peuvent être trouvés au niveau des épidermes des feuilles, des tiges et de certaines parties des fleurs

comme le calice de plusieurs plantes de la famille des Lamiaceae, tel que le Thym (*Thymus sp.*) (Figures 1.5 ; 1.6 ; 1.7) [243].

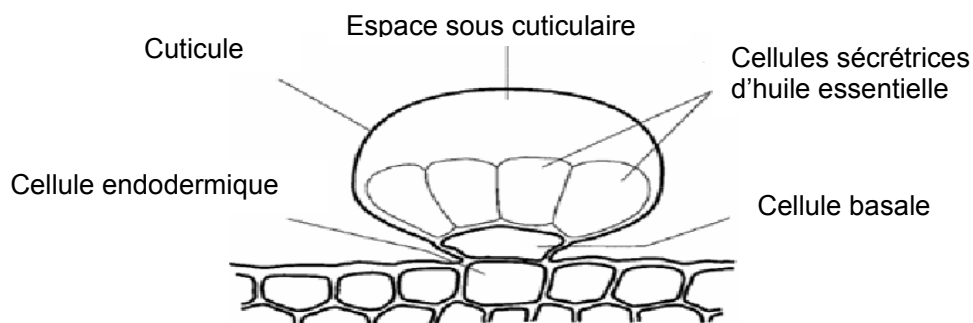


Figure 1.5 : Anatomie d'un trichome glandulaire de *Thymus vulgaris* L. [238].

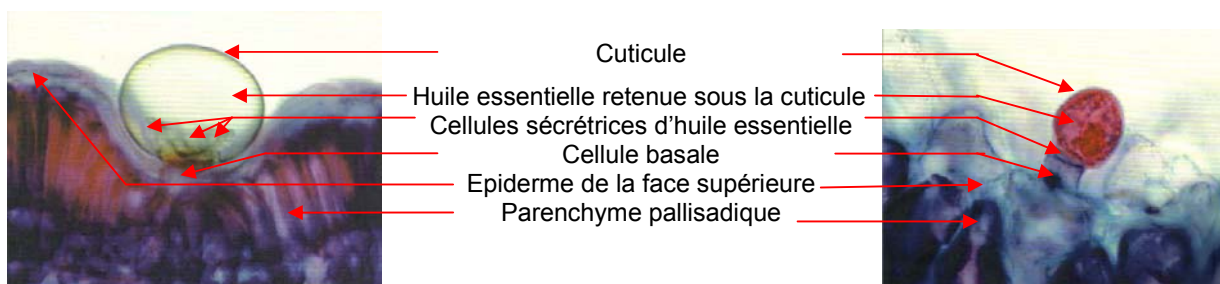


Figure 1.6 : Glande sécrétrice sessile sur la face inférieure de la feuille remplie d'huile (x 420) [243].

Figure 1.7 : Trichome glandulaire avec tête unicellulaire sur la face supérieure de la feuille d'Origan (x 420) [243].

1.3. 3. Fonction biologique des huiles essentielles au niveau de la plante

Comme tout métabolite secondaire, le rôle écologique et évolutif des huiles essentielles a été associé à la défense contre les animaux herbivores et les ravageurs des plantes, la guérison de blessures des organes de la plante, la protection contre des insectes nuisibles, la résistance aux attaques microbiennes (propriétés fongicides et bactéricides), la protection de la plante du rayonnement ultraviolet et des oxydants [69] et l'attraction d'insectes et d'animaux intervenant dans la pollinisation [236; 191]. Elles jouent également un rôle hormonal, régulateur et catalyseur dans le métabolisme végétal, et semblent aider la plante à s'adapter à son environnement et sont par conséquent produites en plus grande quantité dans des conditions extrêmes [243].

1.3. 4. Propriétés des huiles essentielles

1.3. 4.1. Propriétés physiques

Les huiles essentielles possèdent certaines propriétés physiques:

- A température ambiante, elles sont liquides alors qu'elles sont volatiles à température élevée, c'est leur volatilité qui les distingue des huiles fixes telles que l'huile d'olive.
- L'indice de réfraction est généralement élevé et la plus part dévient la lumière polarisée [39].
- Elles sont très solubles dans les solvants organiques (alcool, éther)[236].
- Pouvoir intense de diffusion et de pénétration.
- Leur pouvoir rotatoire est dû à la présence de carbones asymétriques.
- Elles sont très peu solubles dans l'eau.
- Elles ont une densité inférieure à celle de l'eau ($d < 1$), (les huiles essentielles de girofle ou de cannelle, constituent des exceptions) [78].
- Substances très odorantes, souvent colorées [18].

1.3. 4.2. Propriétés chimiques

Les huiles essentielles peuvent s'altérer à l'air et à la lumière [266]. Les dégradations sont nombreuses : Photocyclisation, thermoïsomérisation...etc) [39].

1.3. 5. Composition chimique des H.E

Une huile essentielle peut contenir de 20 à 60 éléments biochimiques différents. On peut déterminer sa composition par la chromatographie en phase gazeuse [16]. Les principales composantes sont : Les terpènes et terpénoïdes, constituants aromatiques [16].

1.3.5.1. Les terpènes

DORMAN et DEANS (2000) définissent les terpènes comme des hydrocarbures dont les squelettes carbonés dérivent de la condensation d'unités isopréniques (C_5H_8) et sont classés selon le nombre de ces derniers comme suit : Les hemiterpènes $C_{10}H_{16}$, les monoterpènes $C_{10}H_{16}$ [266; 222], les sesquiterpènes $C_{15}H_{24}$, les diterpènes $C_{20}H_{32}$ [65], les triterpènes $C_{30}H_{48}$ [223] et les tétraerpènes

$C_{40}H_{64}$ [217]. Les terpènes contenant une molécule d'oxygène sont appelés terpénoïdes [16]. (Voir figures 1.8, 1.9 et tableau 1.1)

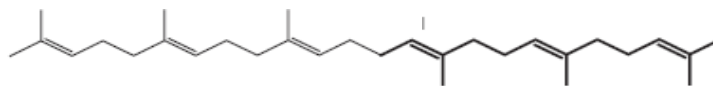
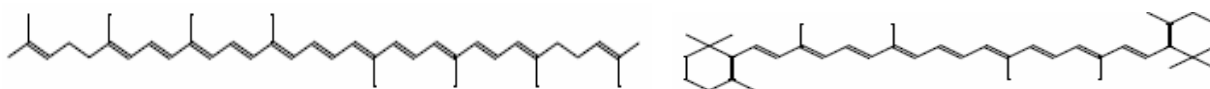


Figure 1.8 : Structure de squalène [223].



Lycopène

β -carotène

Figure 1.9: Structure du β -carotène et du lycopène [217].

Tableau 1.1 : Les composés terpéniques [63; 230; 16; 206]

Classe	MONOTERPENES			SESQUITERPENES		
	Acyclique	Monocyclique	Bicyclique	Acyclique	Monocyclique	Bicyclique
Alcool	 Nerol (citron)	 Menthol (menthe)	 Borneol (sauge)	 Farnesol (tilleul)	 α -Bisabolol (camomille allemande)	 Carotol (carote)
Aldéhyde	 Citral (citron)	 Safranal (safran)	 Myrtenal (Camphre)	 α -Sinensal (Orange)	-	-
Cétone	 Tagetone	 Menthone (Menthe poivrée)	 Camphre (Camphrier)	-	 Atlantone (Cedre)	 Vetivone (Vetivrier)
Carbure	 Myrcène (Laurier)	 Limonène (Orange)	 α -pinène terebentine	 Sesquictronellène (citron)	 Curcumène (Curcuma aromatica)	 Cadinène (Goudron de cade)
Esters	 linalyl acétate.	 α -terpinyl acetate.	 Isobornyl acetate.	-	-	-
Ethers	-	 cineol (eucalyptus)	-	-	-	-
Peroxydes	-	 Ascaridol	-	-	-	-
Phénols	-	 Thymol carvacrol	-	-	-	-

1.3.5.2. Les composés aromatiques

Ce sont des dérivés du phenylpropane, ils comprennent :

- Les Aldehydes: cinnamaldehyde.
- les Alcools: alcool cinnamique.
- Les Phenols: eugenol.
- Les dérivés Methoxy : anethole, estragole, Methyleugenols.
- Les composés dioxyméthylène: apiole, myristicine (Figure 1.10) [16].

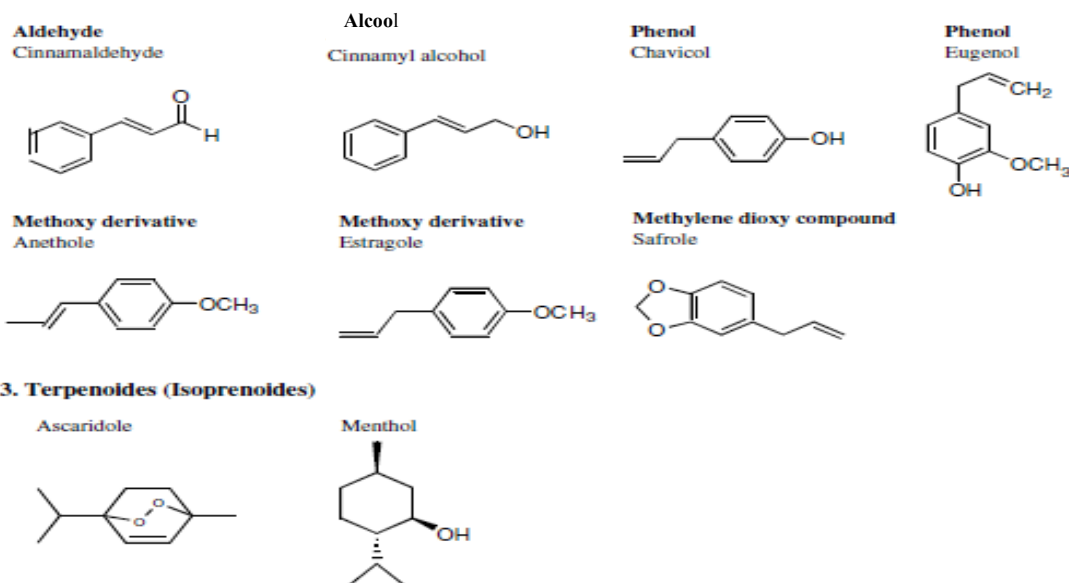


Figure 1.10 : Les composés aromatiques des huiles essentielles [16].

1.3. 5.3. Les molécules diversement fonctionnalisées

Les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînable lors de l'hydrodistillation : carbures (linéaires et ramifiés, saturés ou non), acides(C3 à C10), aldéhydes, esters acycliques, lactones [39].

1.3.6. Conservation des H.E

La relative instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles implique des précautions particulières pour leur conservation. En effet, les possibilités de dégradation sont nombreuses, les conséquences sont multiples par exemple, photo-isomérisation, photocyclisation, coupure oxydative,

décomposition en cétones et alcools, thermo-isomérisation, trans-estérification. Afin d'éviter ces dégradations, Il convient d'utiliser des flacons propres et secs en aluminium vernissé, en acier inoxydable ou en verre teinté, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche, stockage à l'abri de la chaleur et de la lumière [78; 196].

1.3.7. Les facteurs de variabilité des huiles essentielles

Une huile essentielle est très fluctuante dans sa composition selon multiples paramètres, qu'ils soient d'ordre naturel, d'origine intrinsèque (localisation, maturité, origine botanique et chimiotype), soit d'origine extrinsèque liée aux conditions de croissance et de développement de la plante (Sol, climat), ou encore d'origine technologique c'est-à-dire liée au mode d'exploitation du matériel végétal [25].

1.3.7.1. Facteurs d'origine naturelle intrinsèques

1.3.7.1.1. Le cycle végétatif

Pour une espèce donnée la proportion des différents constituants d'une huile essentielle peut varier de façon importante tout au long du développement [39]. Ainsi, la période pendant laquelle la plante est cueillie influence nettement la composition de son huile essentielle [221; 21]. Chez la coriandre, par exemple, la teneur en linalool est 50% plus élevée dans le fruit mûr que dans le fruit vert [39].

1.3.7.1.2. L'organe producteur

La composition de l'huile essentielle d'une même espèce végétale peut varier selon sa localisation dans ce végétal (Feuilles, écorce, fleurs....ec) [39; 21].

1.3.7.1.3. L'origine botanique

Selon SOTO- MENDIVIL et *al.* (2006) et BAYDAR et *al.* (2004), La teneur en huile essentielle ainsi que sa composition peuvent varier d'une espèce végétale à une autre.

1.3.7.1.4. Chimiotype

Les groupes chimiques sont très fréquentes chez les plantes à huiles essentielles, l'un des exemples les plus démonstratifs est celui du *Thymus*

vulgaris L. . En France, On compte pour cette espèce six chimiotypes différents [39].

1.3.7.2. Facteur d'origine naturelle extrinsèque

Les facteurs environnementaux influencent directement la production et la qualité de l'huile essentielle [21]. La température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents exercent une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles (tel que les poils sécréteurs des Lamiaceae). Lorsque la localisation est plus profonde la qualité est beaucoup plus constante [39].

En effet, un climat sec et ensoleillé favorise leur production, cause pour laquelle les plantes sont plus riches en H.E lorsqu'elles poussent dans un climat chaud et sec [21].

Il en est de même des pratiques culturales : densités de plantation, utilisation des engrais, intensité et modalités de l'irrigation [39].

La composition de l'HE peut également dépendre de la saison et des conditions géographiques [21; 236].

1.3.7.3. Facteurs d'origines technologiques

Le mode de récolte; les conditions de transport, de séchage et de stockage des plantes peuvent générer des dégradations enzymatiques importantes [39]. Même les procédés d'extraction et de stockage des H.E peuvent être responsables de leur instabilité [21].

1.3.8. Caractérisation et normalisation

Parmi les normes qui étudient les caractéristiques des huiles essentielles nous citons l'international standard organisation (I.S.O), l'association française de normalisation (A.F.N.O.R), le comité américain des H.E (Américain Essentiel Oils Comity « A.E.O.C »). Ces normes concernent principalement : Les propriétés organoleptiques (couleur, aspect, odeur), les caractéristiques physico-chimiques, et les profils chromatographiques et qualification relatives des différents constituants.

Une huile essentielle sera déclarée de bonne qualité si elle est conforme aux spécifications des normes. Une marge de variabilité est toutefois tolérable [11].

1.3.9. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

1.3.9.1. En thérapeutique

Les huiles essentielles sont très riches en composés biologiquement actifs [199]. Ils possèdent des propriétés antibactériennes [115], antifongiques [235], antioxydante [146], et insecticides [274].

Grâce à leurs pouvoirs curatifs : Spasmolytique [104], antispasmodique [103], anticancer [245], anti-inflammatoire, anti-ulcer [82], antivirale [227]etc, les huiles essentielles sont utilisées pour le traitement ou la prévention contre la plus part des maladies de l'homme.

1.3.9.2. En cosmétologie

Les huiles essentielles sont largement utilisées dans la fabrication des produits cosmétiques tel que les parfums, savons, lotions et pommade de soins....etc.

1.3.9.3. En agroalimentaire

Les huiles essentielles peuvent être utilisées comme additifs alimentaires [73]. Elles sont actuellement employées comme aromes alimentaires, et peuvent servir en même temps comme agents de conservation des aliments grâce à leur effet antimicrobien, et ce d'autant plus qu'elles sont reconnues comme saines [46].

1.3.10. Mode d'utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent s'utiliser par différentes voies.

1.3.10.1. En usage interne

- Par voie orale (ou buccale), Les H.E ne doivent pas être utilisées pures car elles peuvent provoquer des brûlures digestives.
- Par voie rectale sous forme de suppositoires.
- Par voie vaginale sous forme d'ovules [267].

1.3.10.2. En usage externe

- La voie cutanée est la voie la plus fréquemment utilisée car c'est la moins toxique et elle permet une pénétration facile et rapide des H.E à travers la peau puis la circulation générale arrivant aux organes où elles vont exercer leur activité.
- L'H.E peut également être prise par inhalation par ajout de quelques gouttes d'huile essentielle dans un bol d'eau chaude et de respirer les vapeurs ou en déposant quelques gouttes sur un mouchoir propre que l'on respirera profondément [267].

1.3.11. Toxicité des huiles essentielles

Plusieurs expérimentations ont été menées en vue d'évaluer le risque que représente l'emploi des H.E, cependant on trouve mentionnées :

1.3.11.1. La toxicité par ingestion

L'huile essentielle est un extrait concentré qui peut se comporter comme un acide puissant, entraînant l'irritation ou même l'ulcération des tissus; au niveau des muqueuses digestives. Le produit naturel pur ingéré par voie buccale peut donc se révéler comme un agent d'agression [252].

Chez l'homme, des intoxications aiguës sont possibles, les accidents graves, le plus souvent observés chez le petit enfant, sont provoqués par l'ingestion de quantité importante d'huile essentielle [39].

1.3.11.2. La toxicité dermique

Les larges usages que font la parfumerie et la cosmétique de ces huiles essentielles, a suscité de nombreux travaux sur leur éventuelle toxicité par application locale [39].

1.3.12. L'huile essentielle du genre Thymus

1.3.12.1. Composition chimique

Selon STAHL-BISKUP et SAEZ (2002), La composition de l'H.E du Thym est variable selon l'espèce; en générale les monoterpènes constituent environ 90% du total des composantes. Les sesquiterpènes sont toujours présents. La plus part des HE du Thym contiennent des substances de structure aliphatique

mais en faible pourcentage. Les dérivés du phenyl propane quant à eux et les composantes aromatiques, constituent ensemble environ 7.8 % de l'huile (voir figure 1.11).

Ces données ont été confirmées par de nombreuses publications, en effet, la composante principale de l'HE de *Thymus vulgaris* L. de l'Iran est le thymol (70.99%), mais le bornyl acétate ne représente que 4.99% du total des composantes [211].

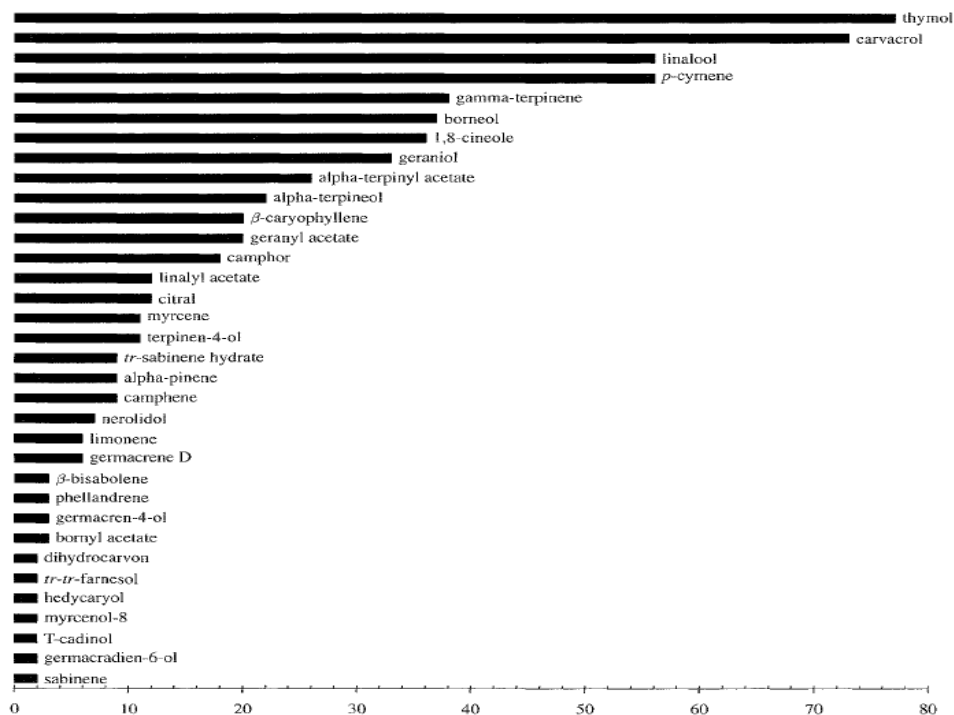


Figure 1.11 : Les principales composantes de l'huile essentielle du genre *Thymus* classées par ordre d'importance [238].

1.3.12.2. Polymorphisme de l'huile essentielle du genre *Thymus*

Six chémotypes du thym vulgaire ont été décrits au sud de la France suivant leur dominance chimique :

- Thym vulgaire à carvacrol.
- Thym vulgaire à géraniol.
- Thym vulgaire à linalool.
- Thym vulgaire à thymol.
- Thym vulgaire à thujanol.
- Thym vulgaire à terpinéol [238].

1.3.12.3 Propriétés thérapeutiques

L'H.E du Thym est connue par ses propriétés : antiseptique [188], antispasmodique, spasmolytique, antihelminthique [226; 1;19], diurétique, expectorante, sédative, tonique [236], antivirus [227], antioxydante [32] et anti-inflammatoire [136].

1.3.12.4. Toxicité

La toxicité aiguë de l'H.E de Thym par voie orale a été évaluée par le calcul de la DL 50 chez les rats, cet effet toxique a été attribué à la présence des phénols terpenes, thymol et carvacrol, qui provoquent également des irritations de la peau et des muqueuses expliquant ainsi les graves irritations observées chez les souris et les lapins après application de l'huile sur leur peau [192].

Plusieurs types d'HE de Thym contiennent une quantité considérable de camphore et de cétones terpéniques qui sont connues par leur pouvoir de provoquer des convulsions et des crises épileptiques neurotoxiques [238].

1.4. Les procédés d'extraction des huiles essentielles

L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'une matière végétale selon diverses techniques [221].

1.4.1. Intérêt de l'extraction

Les Hommes se soignent à l'aide de plantes, qui contiennent des molécules présentant une activité thérapeutique spécifique. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments peut passer par l'étude de ces substances naturelles et si une molécule se trouve être performante dans un domaine précis, elle pourra faire l'objet d'une commercialisation sous forme de médicament [221].

1.4.2. Les méthodes d'extraction

1.4.2.1. La distillation

C'est une opération qui a pour but de séparer les principes volatils contenus dans la plante de ceux qui ne le sont pas ou le sont moins qu'eux. Ce procédé est fondé :

- D'une part, sur la propriété que possèdent les vapeurs développées dans une enceinte de se condenser sur les parois plus froides d'un récipient en relation avec celui dans lequel les vapeurs sont produites.

- D'autre part, sur la propriété qu'ont certaines substances de former des mélanges de vapeurs se formant à température inférieure à celle de vaporisation de chacun d'eux.

Les plantes sont placées dans de vastes alambics et leurs principes volatils seront entraînés par la vapeur d'eau [86].

Pour capter les huiles essentielles contenues dans les plantes à parfum par distillation trois procédés sont régulièrement mis en pratique : L'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodiffusion [26].

1.4.2.1.1. L'extraction par l'entraînement à la vapeur

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal n'est pas en contact direct avec l'eau, il est soumis à l'action d'un courant de vapeur, les principes volatils, peu solubles dans l'eau sont entraînés et après condensation, séparés du distillat par décantation [13].

L'injection de vapeur, au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées, se fait à la base de l'alambic [39].

1.4.2.1.2. Hydrodistillation

Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide [39].

Le condensat d'eau et d'huile essentielle est récupéré dans un erlen meyer puis transféré dans une ampoule à décanter pour la séparation des deux phases [267].

➤ L'hydrodistillation sous pression

C'est une technique de choix pour les essences difficilement distillables où les vapeurs sont injectées sous pression, ce qui augmente considérablement la vitesse de distillation [214]. On traite ainsi certaines matières premières dont les constituants ne peuvent être entraînés par la vapeur à la pression atmosphérique

du fait de leur masse moléculaire élevée tel que les clous de girofle et les rhizomes de gingembre [27].

Bien que le procédé sous pression conduise à une amélioration du rapport d'entraînement, l'influence d'une température élevée (supérieure à 230°C) sur la qualité de l'huile essentielle donne lieu à certains artéfacts [218].

➤ **Turbodistillation**

C'est un procédé d'hydrodistillation accélérée en discontinue dans lequel la matière végétale est broyée in situ [39]. Cette technique est prédestinée aux matières premières végétales difficiles à traiter comme les racines ou les graines. Son objectif est de limiter les inconvénients d'une longue durée d'extraction ou d'une surpression pour activer la distillation à la pression atmosphérique. Le procédé permet en outre la récupération des fractions les plus volatils grâce à un système de condensation secondaire [189; 66].

➤ **L'hydrodistillation assistée par ultrasons**

Le dispositif est basé sur les mêmes principes qu'un extracteur Soxhlet conventionnel, mais modifié pour permettre l'emplacement de la chambre Soxhlet dans un bain de thermostat par lequel les ultrasons sont appliqués au moyen d'une investigation ultrasonique [162]. En effet les microcavitations générées par les ultrasons désorganisent la structure des parois végétales [56].

L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée d'extraction, augmenter le rendement et permettre l'extraction de molécules thermosensibles [162].

➤ **Hydrodistillation assistée par micro-onde sous pression réduite**

Cette technique d'extraction est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. Le matériel végétal à traiter frais ou sec (auquel on rajoute une quantité d'eau) est soumis durant une période aux micro-ondes dont le rôle est d'assurer le transfert de matière, puis durant un deuxième temps à un vide pulsé qui permet l'entraînement des substances volatiles à une température inférieure à 100°C.

L'avantage de ce procédé est de réduire la durée de distillation, l'extraction serait dix fois plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement équivalent et un extrait de composition identique [168].

1.4.2.1.3. Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur. Dans ce cas, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau sur les cellules végétales. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau – huile essentielle » dispersé dans la matière végétal qui s'écouleront vers un collecteur.

Ce procédé évite un grand nombre d'artefacts liés à une température excessive, il donne des produits de qualité, riches en composés oxygénés, même de faible volatilité, qui sont généralement les plus recherchés [161].

1.4.2.2. La distillation fractionnée

Cette technique permet d'isoler un ou plusieurs constituants d'une huile essentielle. Cette opération, très sélective, donne les moyens d'augmenter l'odeur et la finesse en isolant les principaux corps chimiques de l'ensemble des constituants de l'essence. Ainsi parvient-on par fractionnement, soit à des corps reconstitués de la nature, soit à des corps totalement nouveaux. La déterpénation (séparation des terpènes des huiles essentielles) ou la rectification (sélection de fractions intéressantes de l'huile essentielle) sont des techniques d'affinement de l'huile essentielle [59].

1.4.2.3. Extraction par solvant volatil

Les plantes sont immergées totalement dans le solvant à froid sauf pour les graines, les lichens et les racines où l'extraction est réalisée à chaud dans les solvants classiques. Le temps du contact est d'environ 30 minutes, après quoi le solvant est soutiré et remplacé par une deuxième charge puis une troisième à leur tour soutirées. La plus grande partie du solvant est évaporée et recyclée. On recueille une solution concentrée distillée sous vide [214]. L'évaporation des solvants laisse un résidu cireux très coloré et très aromatique appelé la

concrète [86]. Les solvants les plus utilisés actuellement sont l'hexane, cyclohexane et le pentane [214].

1.4.2.4. L'expression

Elle est réservée aux agrumes par suite de la localisation superficielle de l'essence. Il s'agit d'un procédé mécanique dans lequel le fruit entier est placé dans des tambours rotatifs munis de pointes en acier qui déchiquètent le péricarpe. L'huile essentielle est entraînée par l'eau, le mélange est centrifugé et l'on recueille directement une huile essentielle extrêmement naturelle et pure [214].

1.4.2.5. Enfleurage

L'enfleurage convient aux fleurs fragiles, il peut s'effectuer à froid en imprégnant des fleurs fraîches dans de la graisse à froid, cette dernière absorbant ainsi les molécules odorantes. On obtient ainsi une pommade, qui, étant décantée et traitée à l'alcool, entraînera le parfum en le séparant des graisses [59]. L'enfleurage s'effectue également à chaud (la digestion), technique qui consiste à faire fondre dans de grandes marmites au bain-marie de la graisse à laquelle on ajoute les parties de plantes. On peut utiliser cette pommade telle quelle ou la traiter à l'alcool [86].

1.4.2.6. L'extraction au CO₂ supercritique

Le CO₂ sous pression et à température supérieure à 31°C se trouve dans un état "supercritique" intermédiaire entre le gaz et le liquide. Dans cet état, il présente la particularité de dissoudre de nombreux composés organiques et c'est cette même propriété dont les fabricants se servent pour extraire les huiles essentielles.

La matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO₂ est introduit sous pression et réfrigéré. Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion. La pression y étant réduite, le CO₂ reprend sa forme gazeuse et est complètement éliminé, il ne reste plus que l'extract végétal. Les matières premières ainsi obtenues sont proches du produit naturel d'origine d'autant que le CO₂ est non toxique, incolore, inodore et ininflammable [278; 59].

Le coût de l'opération limite cependant son utilisation [214].

1.4.2.7. Extraction au forane 113

C'est une technologie originale d'extraction dont les produits sont : les huiles végétales et les cires ainsi que le support solide constitué de polysaccharides. Le principe de l'extraction au Forane 113 est simple :

- Extraction proprement dite, au cours de cette étape, le forane 113 entraîne également l'eau, ce qui nous permet de récupérer, à la fin, un résidu végétal sec.
- Recyclage du solvant par distillation, cette seconde étape produit une concrète qui est un mélange d'huile fixe et d'huile essentielle.
- Séparation de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur des composés aromatiques [26].

1.4.3. Les facteurs à considérer pour la mise en œuvre des procédés d'extraction

1.4.3.1. La matière végétale

La composition de la matière végétale peut varier en fonction de plusieurs facteurs tel que le lieu, la période de récolte, et la durée du stockage [233; 135].

1.4.3.2. La température

Le rendement en HE augmente avec l'élévation de la température, en effet, lorsque la température s'élève, la pression de vapeur entraînant les composantes des HE est augmentée. Cependant, lorsque la température d'extraction dépasse une certaine limite (supérieure à 230°C), elle peut conduire à une dégradation de l'HE extraite [218].

1.4.3.3. Hydromodule

L'hydromodule doit être en rapport avec la masse végétale car il influence le rendement en huile essentielle. La pharmacopée a établie pour chaque type végétal, les conditions opératoires qui lui conviennent ; ces dernières dépendent de la nature, de la texture et de la richesse en huile essentielle de la plante [193].

1.4.3.4. Durée d'extraction

La durée de l'extraction dépend de la qualité et de la quantité des extraits désirée.

1.4.3.5. La nature du solvant

Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité (pouvoir solvant à l'égard des constituants odorants) ; stabilité ; inertie chimique ; température d'ébullition (pas trop élevée pour permettre son élimination totale, pas trop faible pour éviter les pertes et donc une élévation des coûts) ; sécurité de manipulation (si possible non toxique et ininflammable) [39].

1.4.3.6. Rendement en huiles essentielles

On définit les rendements R_s , R_f , respectivement comme étant le rapport entre la masse d'huile récupérée et la masse de matière végétale sèche ou fraîche traitée. Il est exprimé en pourcentage.

$$R_f = \frac{m}{M_f} \times 100$$

$$R_s = \frac{m}{M_s} \times 100 \quad \dots\dots\dots [218]$$

m : masse d'huile essentielle récupérée (gramme).

M_s : masse de matière végétale sèche traitée (gramme).

M_f : masse de matière végétale fraîche traitée (gramme).

1.4.3.7. Influence du procédé d'extraction

Une meilleure extraction permet toujours d'obtenir une huile essentielle de haute qualité, sans provoquer des dégradations à certaines composantes volatiles, existantes sous forme de traces. De très nombreuses méthodes existent, chacune donnent une image différente de la composition de l'huile essentielle [278; 162].

Si l'on considère le procédé d'extraction par hydrodistillation simple, le rendement en HE chez le Thym est de 1.7%, cependant, Ce dernier peut être triplé lorsqu'on utilise la technique d'extraction par hydrodistillation sous pression [218].

1.5. L'activité biologique des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont des propriétés médicinales nombreuses et variées, elles agissent quasiment dans tous les domaines de la santé et de la maladie.

1.5.1. L'activité antimicrobienne

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large, puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures [75], leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique. La sensibilité des microorganismes peut varier selon le genre testé car une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, bio statique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet [61]

1.5.1.1. Pouvoir antibactérien

C'est la capacité des H.E à s'opposer à la production des bactéries et les détruisant en empêchant leur multiplication, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Les huiles essentielles peuvent agir de différentes manières :

- Attaque de la paroi bactérienne, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composantes de structure.
- Destruction du matériel génétique.
- Augmenter la sensibilité des bactéries à différents procédés de conservation des aliments (chauffage, atmosphère modifiée) [46].

Il semblerait que les bactéries à gram négatif soient plus résistantes aux HE ; Ces résultats sont confirmés par de nombreuses expériences [60]. En effet, des études faites par OUSSALAH et *al.* en 2007, afin de déterminer le seuil d'efficacité (concentration minimale d'inhibition) de quelques HE contre quatre bactéries pathogènes, ont montrées que les bactéries à gram positif ont été sensibles à des concentrations en l'huile essentielle moins élevées par rapport aux bactéries à gram négatif.

1.5.1.2. Pouvoir antifongiques

Elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycéliums des levures alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxine chez les moisissures [46; 61].

1.5.1.3. Pouvoir antiparasitaire

Plusieurs composantes des HE, tel que les terpénoïdes et les alcaloïdes, s'opposent au développement des parasites et les détruisent [61].

1.5.1.4. Pouvoir antiviral

Les virus responsable de certaines pathologies comme le zona, l'herpès, la grippe, le sida, sont traités avec succès par certaines huiles essentielles alors qu'à ce jour la médecine chimique se trouve désarmée [267].

1.5.1.5. Pouvoir insectifuge et insecticides

Plusieurs recherches ont démontrées l'effet ovicide et adulticide des HE contre certains insectes de l'homme et de l'animal [201; 190; 274]. En effet, on a pu démontrer l'efficacité de nombreux HE contre les mites, tel que les espèces de : *Dermatophagoides farinae* (mites des poussières de la maison), qui sont responsables de 69% des allergies de l'homme. Les HE testés ont agits comme répulssives et toxiques contre ces mites [126].

1.5.2. Activité anti- inflammatoire

De nombreuses HE peuvent être utilisées pour traiter ou alléger les processus d'origine inflammatoires [136; 187].

1.5.3. Propriété à visée neurotrope

De nombreuses HE présentent une activité contre tout type de douleurs, d'autres sont connues pour être efficaces contre le stresse, sédatives, relaxantes, anticonvulsive et spasmolytiques [238; 157].

1.5.4. Propriété sur l'appareille cardio-circulatoire

Les HE peuvent renforcer les parois des vaisseaux, stimuler le flux sanguin central et capillaire, réguler l'activité cardiaque, et la pression artérielle [267]

1.5.5. Propriété endocrino-réglatrice

Les HE exercent une action régulatrice sur l'ensemble des glandes endocriniennes de l'organisme. Elles peuvent rééquilibrer le système endocrinien (stimuler ou modérer l'activité d'une glande), elles ont aussi un pouvoir antitoxique, notamment par stimulation des organes d'évacuation des déchets et toxines (les reins, les poumons) [267].

1.5.6. Propriété digestive

Les HE favorisent la motricité intestinale, stimulent les fonctions hépatobiliaires, ont un pouvoir antifermementaire [267].

1.5.7. Propriété immunorégulatrice

Les chercheurs ont pu démontrer l'effet de certaines huiles essentielles sur les cellules immunitaires responsables de la réaction allergique [157].

1.5.8. L'activité biologique liée à la composition chimique

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Évalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile essentielle de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composantes et non seulement à ses composés majoritaires [152]. Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont des phénols, des flavonoïdes, des alcools, des aldéhydes, des cétones, des alcaloïdes et des terpénoïdes [61; 273].

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

La première partie expérimentale (Etude botanique) a été réalisée au niveau du laboratoires de biologie végétale du département de biologie de l'université SAAD Dahleb à Blida, et la deuxième partie (Extraction de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L.) a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie du centre universitaire de Khemis Miliana. La dernière partie expérimentale (Analyses physicochimiques, microbiologiques, étude pharmacotoxicologique) a été effectuée au niveau des laboratoires de physicochimie, de microbiologie et de pharmacotoxicologie du groupe pharmaceutique SAIDAL de Médéa. La plante étudiée a été récoltée dans la région de Beni Rached Située à Chlef.

2.1. Matériels d'études

2.1.1. Matériel non biologique (Voir appendices B, C, F)

2.1.2. Matériel biologique

2.1.2.1. Matériel végétal

Nous avons récolté notre plante dans la région de Beni Rached située au nord de la wilaya de Chlef, au cours de la période allant du mois de Mars 2008 à Novembre 2008.

La récolte n'a concerné que les parties aériennes de la plante (tiges – feuilles).



Figure 2.1 : Plante entière fraîche de *Thymus vulgaris* L. (Originale, 2008).



Figure 2.2 : Feuilles séchée de *Thymus vulgaris* L. (Originale, 2008).

Après la cueillette, les feuilles et les tiges sont entreposées dans un endroit aéré, sec, ombragé et à température ambiante. La durée de séchage est de 6 jours.

Le stockage de notre plante s'est fait dans des sacs en papiers.

2.1.2.2. Matériel animal

Pour la réalisation de notre expérimentation nous avons utilisé des animaux de laboratoires qui ont été élevés au niveau du laboratoire de pharmaco-toxicologie, unité animalerie du complexe Antibiotical-Saidal de Médéa :

✓ Des souris de race Swiss albinos, souche NMRI (Naval Médical Research

Institute, Bethesda, Maryland, USA), d'un poids moyen de $20 \text{ g} \pm 1$ chacune (Figure 2.3).

✓ Des rats de race Wistar albinos, souche WF / ICO (IFFA CREDO ONCINS France), de poids moyen de $190 \text{ g} \pm 5$ chacun ((Figure 2.4).

✓ Des lapins de race hybride entre le Néozélandais souche 1066 SOLAM (Souche de lapin améliorée pour les caractères mâles) et le Californien souche 1077 SOLAF (Souche de lapin améliorée pour les caractères femelles). la sélection a été faite au niveau de l'INRAA (Institut National de la Recherche et de l'Amélioration des Animaux) de Toulouse (au niveau de la station de l'amélioration génétique animal : SAGA) (Figure 2.5). Ils sont âgés de 3 à 4 mois, pesant de 2 à 2.7 Kg et sont adaptés aux conditions répondant aux normes de stabulation (Voir appendice C).

✓ Un chat adulte en bonne santé, femelle non gestante et qui pèse 3 Kg (Figure 2.6).



Figure 2.3 : Souris albinos souche NMRI (Naval Médical Research Institute) (Originale, 2009).



Figure 2.4: Rat Wistar Albinos (Originale, 2009).



Figure 2.5 : Lapin hybride entre le Neozelandais souche 1066 SOLAM et le Carlifonien souche SOLAF (Selection faite par l'INRAA de Toulouse, France) (Originale, 2009).



Figure 2.6: Chat, femelle non gestante (Originale, 2009).

2.1.2.3. Les souches microbiennes

Pour mettre en évidence le caractère antimicrobien des huiles essentielles et des extraits aqueux nous avons utilisé 7 souches bactériennes, cinq souches de champignons phytopathogènes à thalle mycélien, et une espèce de champignon à thalle levuriforme pathogène pour l'homme.

2.1.2.3.1. Les espèces bactériennes

Les bactéries nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie du groupe antibiotical SAIDAL de Médéa ; il s'agit de souches de références (tableau 2.1):

Tableau 2.1: Les souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne

Souches microbiennes	Références
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 1803
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Institut Pasteur
<i>Sarcina lutea</i>	Institut Pasteur

2.1.2.3.2. Les espèces de champignons

Les cinq souches de champignons phytopathogènes ont été identifiées au niveau de L'INRAA d'Alger, l'université de Khemis Miliana, et le laboratoire de mycologie de l'institut d'agronomie de l'université SAAD Dahlab. Leur pathogénéicité a été confirmée par un test d'incubation in vivo sur des plantes hôtes. Ces espèces sont : *Nectria galligena*, *Venturia inaequalis*, *Monilia fructigena*, *Péronospora graminea* isolat 35 BMS 1 et isolat : 16 OUS R3.

La levure testée est *Candida albicans* ATCC 10231. Cette souche nous a été fournie par le laboratoire de microbiologie du complexe antibiotical SAIDAL de Médéa.

2.2. Méthodes d'étude

2.2.1. Identification botanique de la plante

La plante a été identifiée au niveau de :

- L'université Saad Dahleb de Blida : Laboratoire de Biologie Végétale du département de Biologie.
- Le jardin d'essai d'El Hamma.
- Le parc National de Batna.

Les étapes suivies pour l'identification de la plante sont comme suit :

2.2.1.1. Aspect macroscopique

Des spécimens de la plante récoltée ont été comparés à ceux archivés au niveau de l'herbier du jardin d'essai (forme et taille des feuilles et des fleurs, la disposition des feuilles sur la tige, type d'inflorescence, pigmentation de la corolle des fleurs.....etc).

2.2.1.2. Aspect microscopique

2.2.1.2.1. Observations à la loupe

1. Des pièces florales :

- Le nombre de pétales, de sépales, de carpelles et d'étamines a été comptabilisé.
- La présence, la forme, la disposition (droits ou inclinés) et la distribution (sur toute la surface ou regroupés dans des régions privilégiées) des poils tecteurs sur les différentes pièces de la fleur, la tige et les feuilles.
- La présence de poils ou de glandes sécrétrices d'huiles essentielles.

2. De la forme des feuilles, des fruits et celle des tiges.

2.2.1.2.2. Observation au microscope photonique :

Plusieurs coupes histologiques ont été réalisées. Les échantillons étudiés proviennent de la tige, le limbe des feuilles et le fruit. Ils ont été prélevés comme suit :

- La tige : (Figure 2.7, a, b, c, et d).
- Le limbe des feuilles : (Figure 2.8, e et f).
- Le fruit : (Figure 2.9, g).

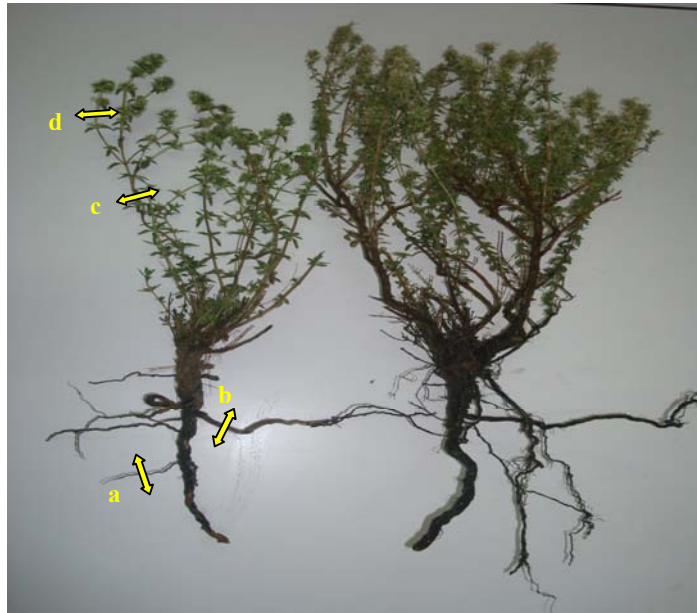


Figure 2.7 : Niveaux des prélèvements de la racine et de la tige (Originale, 2009).

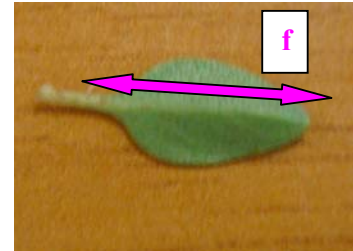
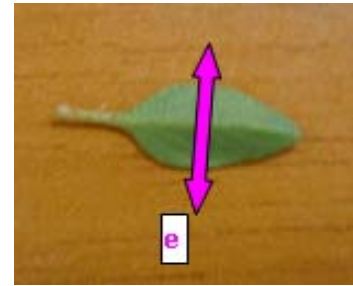


Figure 2.8 : Niveau des coupes de la feuille (Originale, 2009).

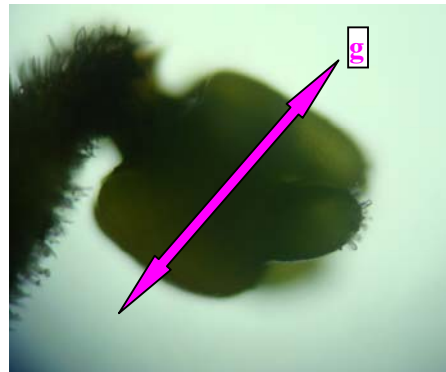


Figure 2.9 : Niveau de la coupe du fruit (Originale, 2009).

Les coupes sont immédiatement recueillies dans de l'eau pour éviter leur dessèchement.

L'objectif de cette étude est de :

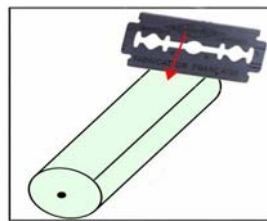
1. Localiser les lieux de sécrétion de la plante, l'identification des différents types d'organes de sécrétion (poils sécréteurs uni ou pluricellulaires, glandes sécrétrices).

2. Connaître la structure des grains de pollens et des fruits.

Cette partie a été réalisée selon la technique décrite par Bensalem et Bendjelloul (1998) qui consiste en une double coloration :

- Réalisation de coupes très fines à l'aide d'une lame de rasoir.
- Placer les coupes 10 à 20 minutes dans l'hypochlorite de sodium à 12° (Destruction des structures cytoplasmiques).
- Laver abondamment à l'eau.
- Traiter par l'acide acétique dilué au 1/10 ème pendant 1 à 2 min (mordantage qui a pour but d'augmenter l'affinité des colorants).
- Laver à l'eau courante pendant 5 à 10 min.
- Colorer 15 à 20 minutes dans le vert de méthyle.
- Rincer les coupes à l'eau courante 5 à 10 min puis plonger dans le rouge Congo 15 à 20 min.
- Après lavage à l'eau courante, monter les coupes colorées entre lame et lamelle puis observer au microscope photonique.

1- Réalisation des coupes :



2- Les différentes étapes de la double coloration :

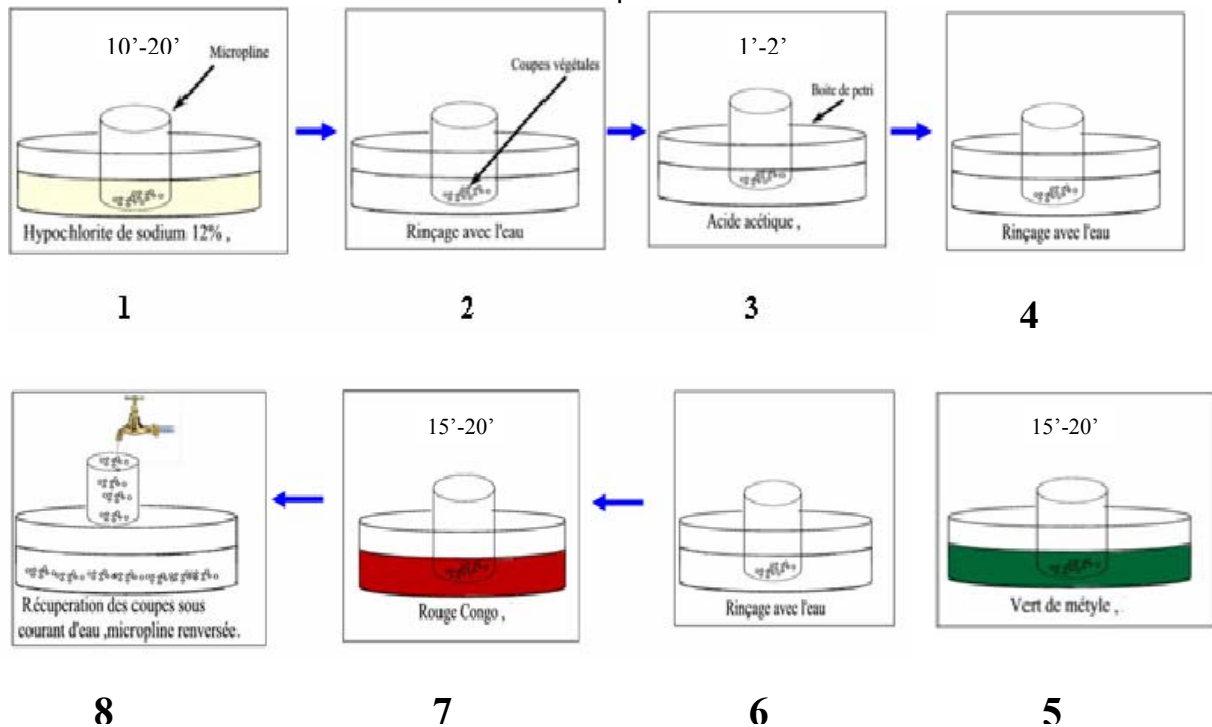


Figure 2.10 : Technique de la double coloration.

2.2.2. Détermination du pourcentage des minéraux

2.2.2.1. Principe

La détermination du pourcentage des minéraux est effectuée selon un procédé chimique dans lequel le composé est chauffé au dessus de son point de fusion. Le but est d'éliminer les constituants carboniques et de garder les éléments minéraux [195].

2.2.2.2. Mode opératoire

- Chauffer au rouge un creuset de silice ou de platine pendant 30 minutes.
- Laisser refroidir dans un dessiccateur, puis peser.
- Introduire dans le creuset 1 g de substances ou de drogues pulvérisées.
- Incinérer dans un four à moufle à une température de 400 C° pendant 5 heures. L'échantillon ne doit pas s'enflammer pendant l'opération.
- Laisser refroidir le creuset au dessiccateur puis peser [195].

2.2.2.3. Calcul

Le pourcentage des minéraux est évalué selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage du résidu} = \frac{(m_c + m_R) - m_{cv}}{m} \times 100$$

- $(m_c + m_R)$: creuset + résidu.
- m_{cv} : creuset vide.
- m : poids de l'échantillon en gramme [195].

2.2.3. Etude phytochimique de *Thymus vulgaris* L.

2.2.3.1. Screening chimiques de certains métabolites secondaires de *Thymus Vulgaris* L.

Le screening chimique est un ensemble de réactions chimiques simples permettant d'orienter rapidement vers l'étude détaillée de quelques types de constituants chimiques. Ces tests permettent de connaître la constitution en

métabolites secondaires du *thymus vulgaris*. Ils sont réalisés soit sur la poudre de Thym, soit sur un infusé. Les résultats seront classés selon :

- Réaction franchement positive : + + +
- Réaction moyennement positive : + +
- Réaction positive : +
- Réaction difficile à interpréter : ±
- Réaction négative : - [180].

2.2.3.1. 1. Préparation de l'infusé

A 10g de poudre, on ajoute 50 ml d'eau distillée, le mélange est porté à ébullition sur une plaque chauffante pendant 15 minutes, après filtration, le filtrat est ajusté à 50 ml avec l'eau distillée.

2.2.3.1. 2. Révélation des métabolites

❖ Mucilages

A 1 ml de l'infusion à 10% ajouter 5 ml d'éthanol absolu. L'obtention d'un précipité floconneux, par mélange, indique la présence de mucilages [180; 74].

❖ Caroténoïdes

Après évaporation jusqu'à sec de 5 ml d'extrait méthanolique, ajouter 2 à 3 gouttes d'une solution saturée de trichlorure d'antimoine dans du chloroforme ou dans du tétrachlorure de carbone (CCl₄) (Voir appendices). Il se développe en présence de caroténoïdes une coloration bleue devenant rouge par la suite [180 ; 74].

❖ Dérivés anthracéniques

- Antraquinones libres : Réaction de Borntrager

A 1g de poudre, ajouter 10 ml de chloroforme et chauffez pendant 3 minutes. Filtrer à chaud et compléter à 10 ml si nécessaire. A 1 ml de l'extrait chloroformique obtenu ajouter 1 ml de KOH dilué à 10% et agiter. La coloration plus ou moins rouge indique la présence d'antraquinones libres [216; 180; 261; 223].

- **Anthracéniques combinés : Les O- hétérosides**

Préparer un hydrolysats à partir du résidu de la drogue épuisée par le chloroforme auquel il faut ajouter 10 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré puis maintenir le tube à essai au bain-marie bouillant pendant 15 minutes; Le but de l'hydrolyse acide est d'hydrolyser les anthraquinones glycosides en aglycones [223]. 5 ml de l'hydrolysats sont agités avec 5 ml de chloroforme. A la phase organique, ajouter 1 ml de NH_4OH dilué au demi ($f=1/2$) et agiter. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines O-hétérosides [180 ; 74].

❖ **Tanins**

1.5 g de poudre est placée dans 10 ml de méthanol à 80%, après 15 minutes d'agitation, les extraits sont filtrés. Dans un tube à essai contenant 1 ml de cet extrait, ajouter 1 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 1% ; Cette dernière, permettra de détecter la présence ou non de tanins [223]. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques [216; 195; 261].

Tanins catéchiques (non hydrolysable)

Ajouter à 5 ml d'infusé, 1 ml d'alcool chlorhydrique (5 ml d'alcool à 95°, 5 ml d'eau distillée, 5 ml d'acide chloridrique concentré), le tout porté à ébullition pendant 15 minutes. En présence de tanins catéchiques, il y a formation d'un précipité rouge soluble dans l'alcool amylique [74].

❖ **Identification des Alcaloïdes : Test de Dragendorff**

Ce test est fondé sur la capacité qu'ont les alcaloïdes à se combiner avec les métaux lourds ou l'iode [209].

Préparation de l'extrait méthanolique

2 g de poudre sont ajoutés à 100 ml de méthanol 50%. Après une sonication de 15 minutes et agitation toute la nuit, les extraits sont filtrés et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les résidus sont repris dans

quelques ml de méthanol pur. Ces extraits sont soumis au test de Dragendorff [209].

Réaction de Dragendorff

Ajouter 1 ml de solution de tétraiodobismuthate de potassium (réactif de Dragendorff). Leur présence est indiquée par la formation immédiate d'un précipité rouge ou rouge orangé [197; 261; 223].

2.2.3.2. Détermination de la teneur en certains composés chimiques de *Thymus vulgaris* L.

2.2.3.2.1. Dosage des composés non volatils

2.2.3.2.1.1. Les techniques de dosages

Le dosage des différents métabolites secondaires a été effectué grâce à la technique d'absorption dans les domaines du visible à l'ultraviolet (UV/VIS) qui a pour but de localiser la longueur d'onde dans laquelle il y a le maximum d'absorption des échantillons et de leurs blancs réactifs [108], et par la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) qui permet l'analyse des substances peu volatiles de masse moléculaire pouvant atteindre 2000.000, les substances ionisées, les molécules d'intérêt biologique, et aussi la séparation et l'analyse des polymères [232].

➤ Spectre dans le domaine de la lumière visible au ultraviolette (U.V/VIS)

Le principe de la spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 à 800 nm, ce qui correspond à l'ultraviolet (190-400 nm) et au visible (400-800 nm) [79]. L'absorbance est obtenue par application de la loi de BEER-LAMBERT :

$$A = \text{Log} \frac{I_0}{I} = \epsilon_{\lambda} l C$$

Avec : ϵ_{λ} : Coefficient d'extinction moléculaire.

I_0 : Intensité du rayonnement incident.

I : Intensité du rayonnement transmis.

l : Longueur du chemin optique (cm).

C : Concentration molaire du soluté [52; 79].

➤ **La chromatographie en phase liquide à haute performance (H.P.L.C)**

C'est un type de chromatographie qui utilise une phase mobile liquide et une phase stationnaire très finement divisée [232]. La phase mobile est pompée dans la colonne et l'opérateur est maître du débit ; l'injection est effectuée par une vanne à boucle sans interruption du débit de la pompe et les solutés sont injectés dans un système équilibré. Les solutés séparés sortant de la colonne, sont élués et détectés en continu [231].

2.2.3.2.1.2. Dosage spectral des composés phénoliques

➤ **Extraction des composés phénoliques**

L'extraction des composés phénoliques est réalisée selon la méthode décrite par TAWAHA *et al.*(2007), comme illustrée dans la figure 2.11.

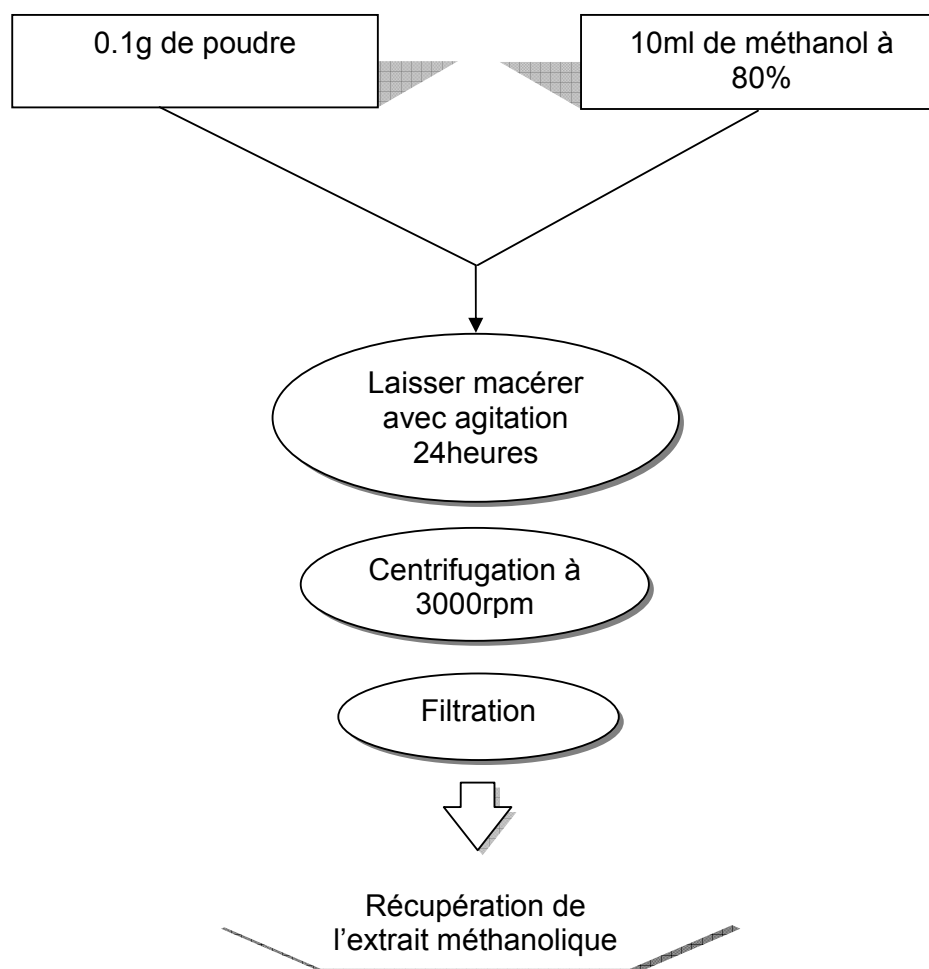


Figure 2.11 : Protocole d'extraction des composés phénoliques totaux selon TAWAHA et *al.* (2007)

➤ **Détermination des composés phénoliques totaux**

Le dosage des composés phénoliques totaux est effectué selon la méthode utilisée par HAYOUNI *et al.* (2007) et WOJDYLOA *et al.* (2007) illustrée dans la figure 2.12.

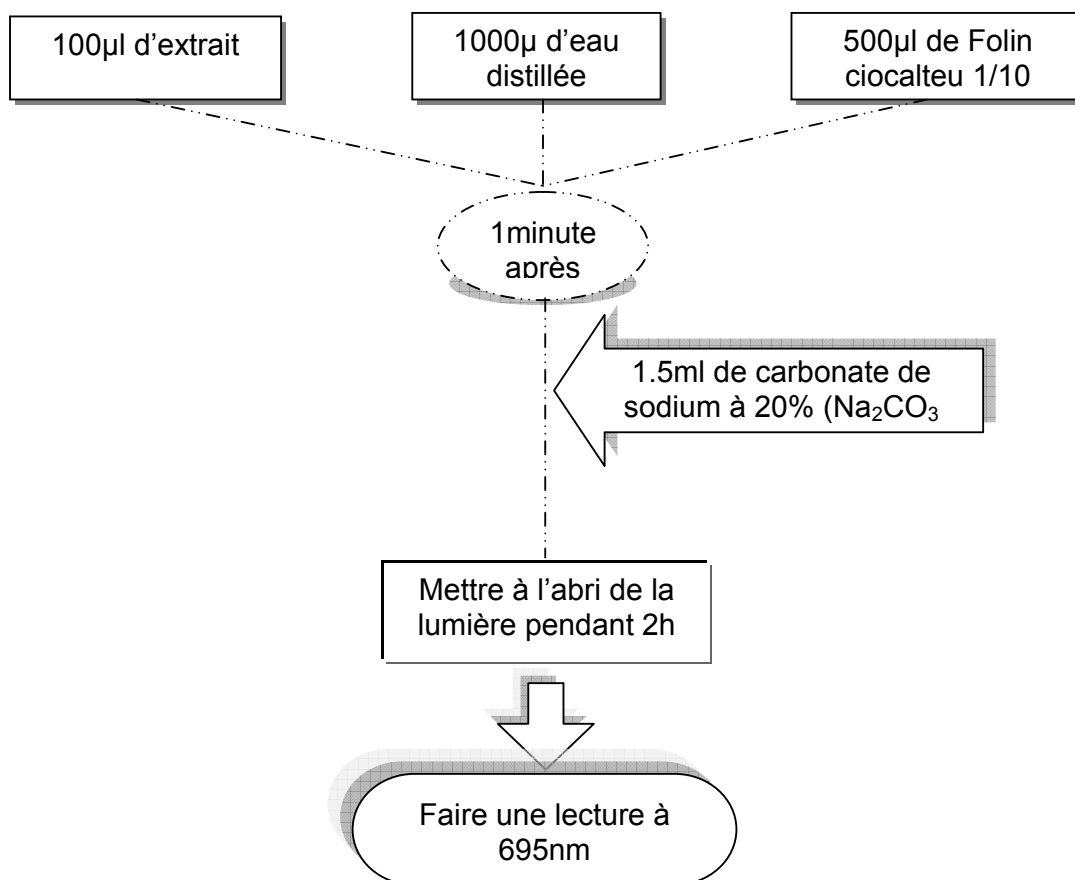


Figure 2.12 : Protocole du dosage des composés phénoliques totaux selon HAYOUNI et *al.* (2007)

Le témoin est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par du méthanol.

La concentration en composés phénoliques, des différents échantillons est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage utilisant de l'acide gallique ($C_7H_6O_5$) comme standard.

- **Analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) des composés phénoliques**
 - ❖ **Préparation des échantillons**

Le protocole adopté est celui de MARCULESCU et *al.* (2007), les étapes sont résumées dans la Figure 2.13.

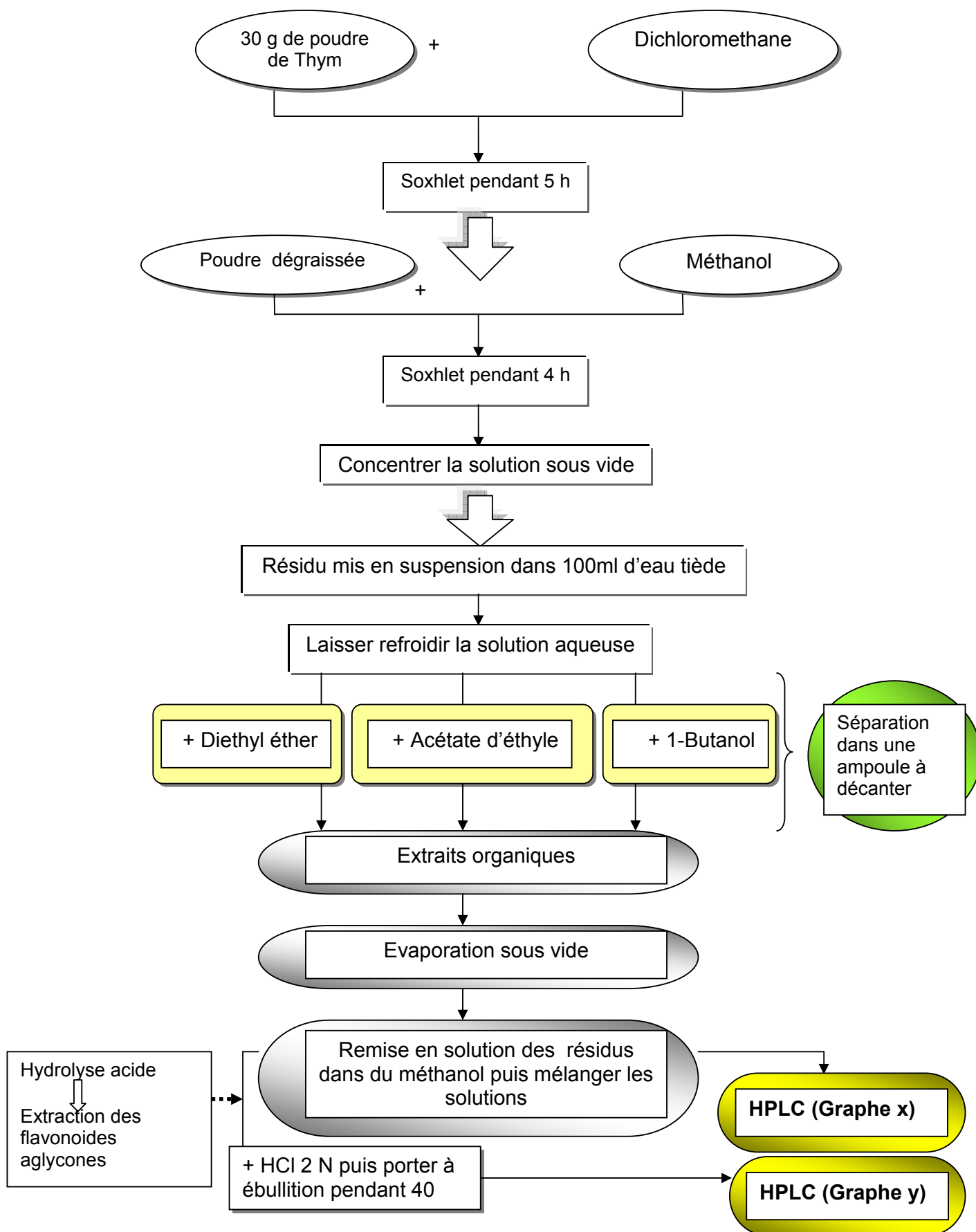


Figure 2.13 : Schéma illustrant la préparation des échantillons pour l'analyse par HPLC

L'hydrolyse acide permet d'obtenir, après rupture des liaisons C-O-C présentes chez les hétérosides, les aglycones flavonoïdes et les anthocyanidol [154].

La teneur des polyphénols totaux pourrait être calculée à partir du poids du résidu final sec par rapport à la prise d'essai.

❖ Analyse par HPLC

La phase mobile est un gradient binaire constitué de méthanol pour analyse (99.99% de pureté) et une solution tampon, cette dernière a été préparé à partir de KH₂PO₄ à 40 mM dans de l'eau distillée, puis le pH a été ajusté jusqu'à 2.3 avec une solution d'acide orthophosphorique à 85%.

Le gradient est au départ linéaire, à partir du méthanol à 5% jusqu'au méthanol à 42%, ceci pendant les premières 35 minutes, suivi d'une élution isocratique avec du méthanol à 42% plus de 3 minutes. Le débit est de 1 ml/min, la longueur d'onde est de 330 nm [163].

Toutes les composantes ont été identifiées par comparaison avec les temps de rétentions des standards (Voir tableau 2.2et figure 2.14).

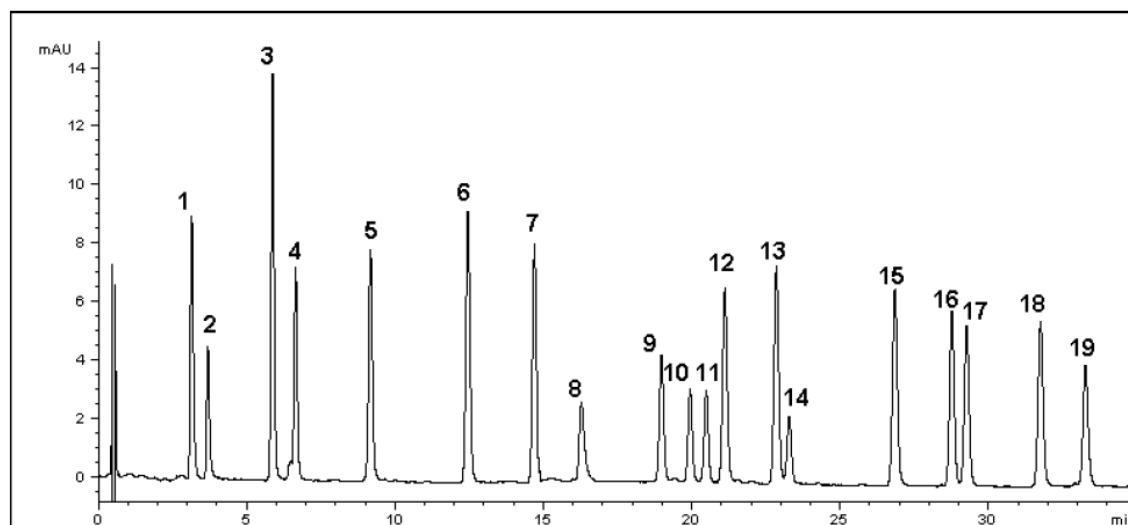


Figure 2.14 : Chromatogramme de l'HPLC des standards externes (UV 330 nm).

Tableau 2.2: Les temps de rétention (Rt) des différents standards selon MARCULESCU *et al.* (2007) :

R _t	Standards	N°
3.27	Acide caftarique	1
3.76	Acide gentisique	2
6.1	Acide cafeique	3
6.8	Acide chlorogénique	4
9.49	Acide 5-p- coumarique	5
12.8	Acide ferulique	6
15.01	Acide sinapique	7
15.83	Acide cichorique	8
19.32	9-Hyperozid	9
20.27	Isoquercitrine	10
20.78	Rutozid	11
21.2	Miricetol	12
23.1	Fisetine	13
23.64	Quercitine	14
27.57	Quercetol	15
29.39	Patultine	16
29.93	Luteoline	17
32.5	Kaempferol	18
33.95	Apigénine	19

2.2.3.2.1.3. Dosage spectral d'autres métabolites secondaires

➤ Dosage des flavonoïdes

La méthode utilisée pour le dosage des flavonoïdes est celle décrite par DJERIDANE *et al.* (2006) (figure 2.15).

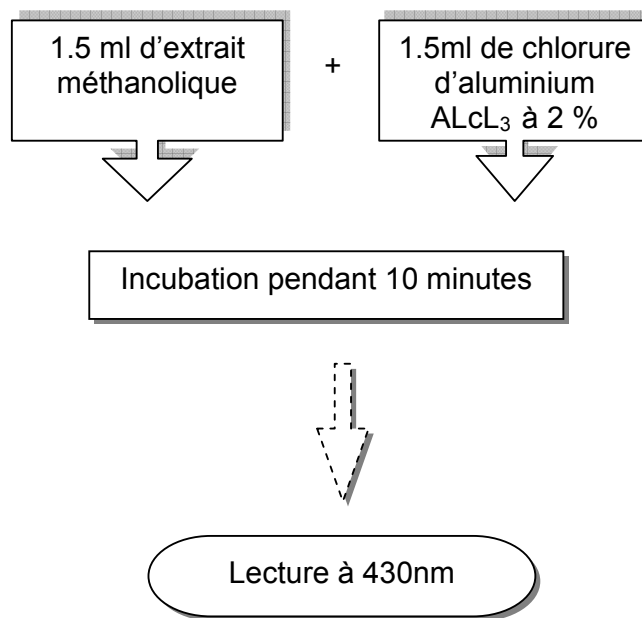


Figure 2.15 : Protocole de dosage des Flavonoïdes selon DJERIDANE *et al.* (2006).

Le témoin est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par du méthanol.

La concentration en flavonoïdes des différents échantillons est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage utilisant de la quercétine ($C_{15}H_{10}O_7$) comme standard.

➤ **Dosage des chlorophylles**

Le dosage des chlorophylles est réalisé en se basant sur la méthode de CUBAS et *al.* (2008) avec de légères modifications (figure 2.16).

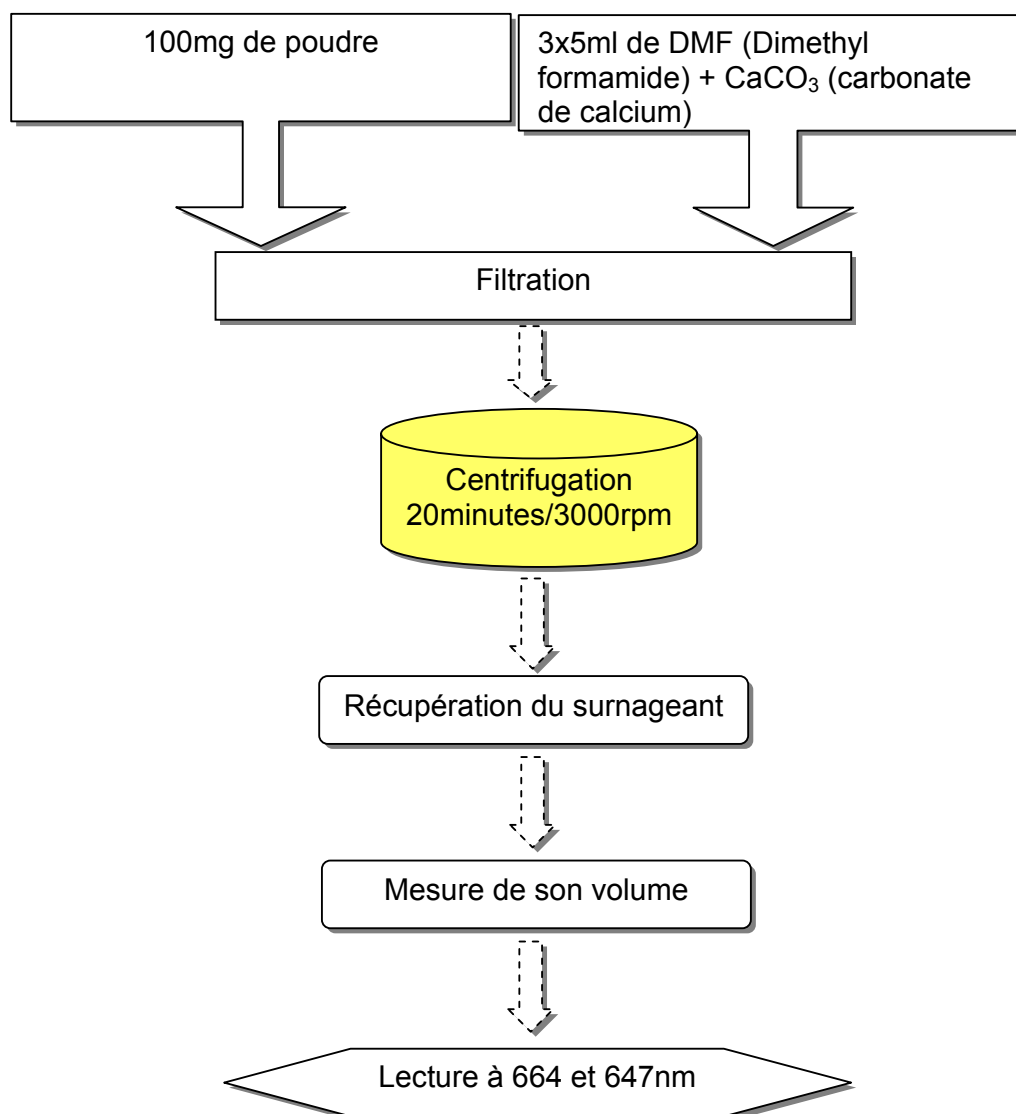


Figure 2.16 : Protocole d'extraction et de dosage des chlorophylles selon CUBAS et *al.* (2008).

Chlorophylle a \rightarrow Abs₆₄₇

Chlorophylle b \rightarrow Abs₆₆₄

Calcul des deux types de chlorophylles

Chlorophylle a (mg/l) = $(8.9 \times \text{Abs}_{664} - 1.9 \times \text{Abs}_{647}) - 0.11$.

Chlorophylle b (lg/l) = $(30 \times \text{Abs}_{647} - 7.1 \times \text{Abs}_{664}) - 0.98$.

➤ **Dosage des caroténoïdes**

La méthode utilisée pour l'extraction et le dosage des caroténoïdes est celle décrite par SASS-KISS et *al.* (2005) (figure 2.17).

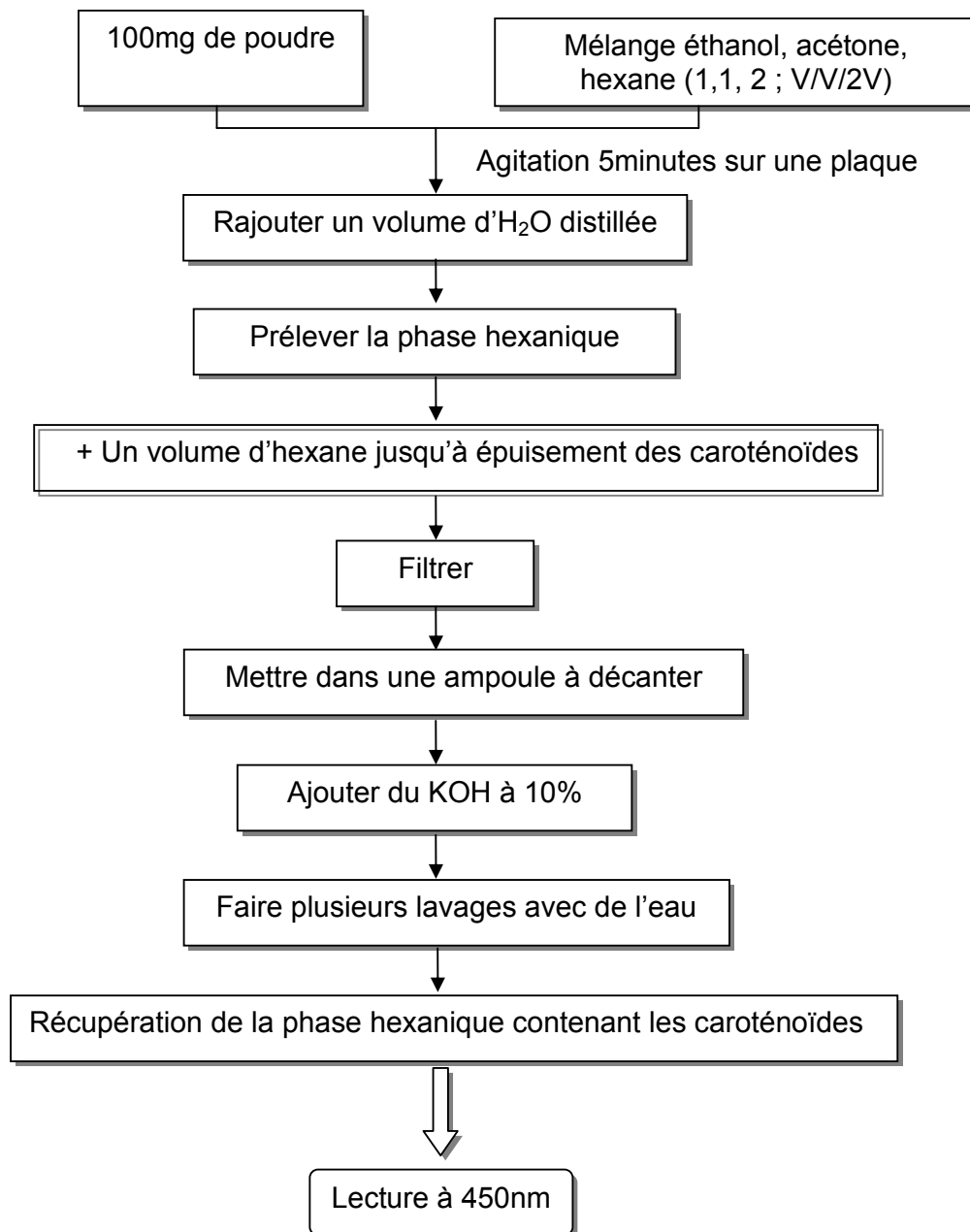


Figure 2.17 : Protocole d'extraction et de dosage des caroténoïdes selon SASS-KISS et *al.* (2005).

2.2.3.2.2. Dosage des composés volatils

Les extractions d'huile essentielle sont faites à partir des feuilles.

2.2.3.2.2.1. Extraction et séparation des huiles essentielles de *Thymus vulgaris L.*

L'étude faite par HEDHILI et *al.* (2007), sur la cinétique et le rendement d'extraction des huiles essentielles de Thym obtenues par hydrodistillation et entraînement à la vapeur, a montré que 70% du rendement global de l'huile essentielle par hydrodistillation est obtenu dans les 18 premières minutes, le rendement cumulé se stabilise au bout d'une heure (0,46%). Ceci nous mène à choisir la méthode d'extraction par hydrodistillation, d'autant plus que le dispositif est disponible. D'autre part, la récupération de l'huile essentielle est facile et directe dans le cas d'hydrodistillation, car l'huile s'accumule dans la partie « L » de l'hydrodistillateur (Clevenger) pour être directement récoltée dans des flacons en ouvrant le robinet; contrairement à l'entraînement à la vapeur d'eau où l'HE est mélangée dans l'eau et doit être séparée par la suite (étape supplémentaire).

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée à l'aide d'un hydrodistillateur type Clevenger selon les recommandations de la pharmacopée européenne (2001), ce dernier est représenté dans la figure 2.18.

• Mode opératoire

Dans le ballon, introduire la quantité de matière végétale et procéder à l'hydrodistillation.

- Adapter au ballon l'appareil de condensation.
- Chauffer l'eau du ballon jusqu'à début d'ébullition et distillez à la vitesse appropriée.
- Le distillat est recueilli dans le tube gradué qui se termine par une ampoule, cette dernière est munie à la base d'un robinet à partir duquel on pourra récupérer notre fraction d'huile essentielle, tandis que la fraction aqueuse retourne automatiquement dans le ballon générateur de vapeur. Donc la séparation des deux phases non miscibles se fait dans l'appareil en même temps que la distillation.

- Arrêter le chauffage et lire le volume de l'huile essentielle recueillie dans le tube gradué.

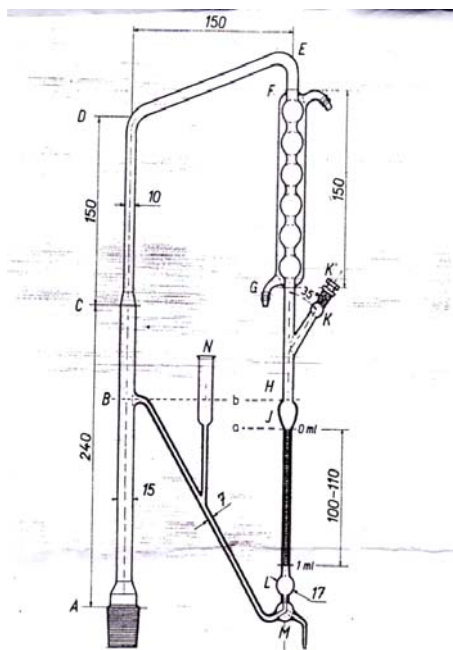


Figure 2.18: Appareil pour l'extraction des huiles essentielles, dimensions en millimètres selon la Pharmacopée européenne (2001).

2.2.3.2.2. Etude cinétique de l'hydrodistillation de *Thymus vulgaris* L.

Pour optimiser les conditions d'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Thymus vulgaris* L., nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence sur le rendement en huile essentielle (Rd HE), des paramètres accessibles expérimentalement.

- La masse de la matière végétale.
- L'hydromodule
- La durée d'extraction
- La période de récolte.
- Après plusieurs essais préliminaires et selon les résultats de ROUATBI et *al.* (2007), la meilleure température d'extraction, pour laquelle on obtient un meilleur rendement et une bonne qualité de l'huile essentielle de thym, est de 175°C. Cette valeur a été adoptée dans toutes les extractions réalisées.

Le rendement en huiles essentielles (exprimé en pourcentage) a été calculé par la relation suivante :

$$\text{Rd HE (\%)} = (\text{m HE} / \text{m MV}) \times 100$$

- Rd HE (%) : rendement en huiles essentielle exprimé en pourcentage.
- m HE : La masse d'huile essentielle récupéré.
- m MV : La masse de la matière végétale utilisée

Mise à part l'expérimentation sur l'influence de la période de récolte, toutes les expérimentations des facteurs influençant l'extraction ont été menées dans un ballon à capacité de 500 ml.

✚ Influence de la masse de la matière végétale sèche sur le rendement en huiles essentielles

- Etat de la matière végétale : sèche
- Le volume d'eau : 250 ml
- La durée d'extraction : 2h 30 min
- La température d'extraction : 175 C°
- Période de récolte : Mois de mai.
- Masse de la matière sèche variable : 10, 15, 20, 25, 30 g.

Cinq essais ont été effectués pour cinq masses différentes de la matière végétale.

✚ Influence de l'hydromodule sur le rendement en huiles essentielles

L'hydromodule c'est le rapport de la masse végétale sur le volume d'eau utilisée pour l'extraction (m MV / V eau)

- Etat de la matière végétale : sèche
- Masse de la matière végétale : 25g
- La durée d'extraction : 2h 30 min
- La température d'extraction : 175 C°
- Période de récolte : Mois de mai.
- Volume d'eau variable : 100, 125, 150, 200, 250, 300 ml.

✚ Influence de la durée d'extraction sur le rendement en huiles essentielles

Les expériences ont été menées pendant une durée de trois heures. Le rendement est évalué toutes les 15 minutes, puis les extraits obtenus après 30 minutes et après 3 heures d'extractions ont été analysés par la CPG/SM en vue de faire une comparaison qualitative (types de composés extraits) et quantitative (pourcentage de chaque composé).

- Etat de matière végétale : sèche
- Masse de matière végétale : 25 g
- Volume d'eau : 250 ml
- La température d'extraction : 175 C°
- Période de récolte : Mois de mai.
- Temps variable : De 15 min jusqu'à 3 h.

✚ Influence de la période de récolte sur le rendement en huiles essentielles

L'ensemble des expériences ont été effectués sur une matière végétale fraîche et une matière végétale séchée à l'ombre pendant une semaine sous forme étalé, la récolte de ces plantes a été effectuée durant les mois de Mars, Avril, Mai et Novembre. Les extraits d'huile essentielle obtenus des feuilles de thymus récoltés les mois de mai et novembre ont été analysés par CPG/ SM afin de faire une comparaison qualitative et quantitative de la composition chimique de chaque H E.

- Masse de matière végétale : 25 g
- Volume d'eau : 250 ml
- La durée d'extraction : 2h 30 min
- La température d'extraction : 175 °C
- Période de récolte variable : Mars, Avril, Mai, Novembre.

Afin d'évaluer la qualité et la composition des huiles essentielles extraites lors de cette étude, des analyses ont été menées pour déterminer leur propriétés organoleptiques et physico-chimiques. En ce qui concerne les analyses

qualitatives et quantitatives, elles sont effectuées par CGSM (Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectre de masse).

2.2.3.2.2.3. Les caractéristiques organoleptiques des extraits d'huile essentielles

Chaque huile essentielle est connue par ses caractéristiques organoleptiques, tel que l'odeur, la couleur et l'aspect. Ces derniers dépendent des produits qui constituent l'huile essentielle.

2.2.3.2.2.4. Analyses physicochimiques

Analyses physiques

➤ **La densité** On pèse 2ml de l'huile étudiée à l'aide d'un pycnomètre tarée, puis on calcule la densité en appliquant la formule suivante :

m_1 : poids du pycnomètre avec HE

$$d = \frac{m_1 - m}{m_2 - m}$$

m_2 : poids du pycnomètre avec l'eau distillée

m : poids du pycnomètre vide [198].

➤ **Pouvoir rotatoire** Le pouvoir rotatoire spécifique d'un liquide est exprimé en milliradians ou degrés d'angle par dm^{-1} , et calculé par la formule :

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \cdot \rho_{20}} \quad \text{avec :}$$

α = angle de rotation en degrés lu à $20 \pm 0,5$ °C.

l = longueur en décimètres du tube polarimétrique.

ρ_{20} = masse volumique à 20 °C en grammes par centimètre cube.

Elle peut être remplacée par la densité relative.

Un pouvoir rotatoire dextrogyre ou lévogyre étant désigné respectivement par (+) et par (-) [198].

➤ **L'indice de réfraction** Il est déterminé à $20 \pm 0,5$ °C et rapporté à la raie D du sodium ($\lambda = 589,3$ nm) ; le symbole est alors: n_D^{20} une fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente et de la température^D.

On note : $n_D^{20} = n_D^t + (t - 20) \times 0,0004$

t : La température de laboratoire.

D : La raie de sodium.

η_D^t : Valeur de la lecture obtenue à la température « t » [198].

Analyses chimiques

➤ **Indice d'acidité (I_a)** C'est le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1 g d'huiles essentielles. On pèse avec précision 0,5g d'huile essentielles et on les dissout dans 2 ml d'éthanol, puis on ajoute 3 gouttes de phénophtaléine, ensuite neutraliser le liquide avec la solution de KOH (0,1N). L'indice d'acide est donc donné par la formule :

$$I_a = \frac{5,61 \times V}{m}$$

V : Le volume en « ml » de la solution de KOH consommé.

m : La masse en « g » de la prise d'essai [198].

➤ **Indice d'ester (I_e)** C'est le nombre qui exprime en " mg" la quantité de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenue dans 1 g de l'HE. Il est calculé à partir de :

$$I_e = I_s - I_a$$

I_s : Indice de saponification,

I_a : Indice d'acide [198].

➤ **Le pH** La concentration en ion H₃O⁺ dans la solution est appelée puissance hydrogène ou pH, selon la relation :

$$pH = -\log(\text{concentration H}_3\text{O}^+) \text{ [198].}$$

➤ **Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectromètre de masse GC / MS**

C'est une méthode séparative qui permet d'analyser quantitativement des mélanges complexes de gaz ou de composés qui peuvent être volatilisés sans être décomposés [108].

Dans toute méthode chromatographique, les séparations sont fondées sur la distribution des solutés entre deux phases non miscibles, l'une fixe dite phase stationnaire, l'autre en mouvement dite phase mobile. Dans le cas de la CPG ; la phase mobile est un gaz, dit gaz vecteur, et les solutés sont introduits sur la colonne directement s'il s'agit d'un échantillon gazeux ou après volatilisation dans la chambre d'injection chauffée s'il s'agit d'un échantillon liquide [52; 255]. Le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée. L'analyse par spectrométrie de masse nécessite par conséquent la formation initiale d'ions, à l'état gazeux, à partir de l'échantillon [31].

Un couplage chromatographie- spectrométrie de masse consiste à réaliser un appareillage permettant de réunir en série, plusieurs sous-ensembles, traversés successivement par les échantillons à analyser.

Le chromatographe en phase gazeuse couplé au spectre de masse utilisé pour l'analyse de nos échantillons est de type Perkin Elmer tubomass gold. Les échantillons d'huile essentielle sont analysés dans les conditions opératoires suivantes :

CPG

- Mode d'injection : Spitless
- La température de l'injecteur: 250 °C
- Volume d'injection : 1 µl
- La programmation de température : de 40 °C à 250 °C à raison de 6 °C / min.
- Durée d'acquisition : 40 min
- Le gaz vecteur : Helium à 1 ml/ min (Vitesse linéaire moyenne = 36 cm / sec)

Spectromètre de masse

- Les températures de la source et du quadripôle sont fixées respectivement à 220 °C et 280 °C.
- Le potentiel d'ionisation : 70 eV.
- Gamme de masse (m/z) : 40 à 400 amu [196].

En se basant sur les temps de rétention des standards de la banque de données informatisées, nous allons identifier sur les chromatogrammes obtenus avec les différentes fractions d'huiles essentielles, les composantes de ces échantillons d'huiles, puis on déterminera leurs teneurs en pourcentage. Il est à noter qu'on ne tient pas compte du pic dû à l'hexane.

2.2.3.2.2.4. Etude de la toxicité de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris L.*

Comme tout produit actif, l'HE de *Thymus vulgaris L.* peut donner lieu à des effets plus ou moins indésirables ou nocifs. Les modes d'administration traditionnels sont la voie orale et l'application cutanée. Il est logique d'apprécier sa toxicité par ces deux voies.

+ Détermination de la toxicité aiguë de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris L.* administré par voie orale

IVAN, en 1928 pensa à une méthode chiffrée de comparaison de la toxicité des substances chimiques. Il créa alors la DL₅₀ (Dose létale de 50 % des animaux testés). Selon HODGSON (2005), les effets rencontrés avec la toxicité aiguë consistent généralement en mortalité et /ou en morbidité .

La différence entre les toxicités aiguë et chronique est illustrée dans les figures 1 et 2 du glossaire.

But

Elle permet de connaître le degré de toxicité d'un produit, en fonction de la voie d'administration et de l'espèce animale. Le résultat obtenu ne permet pas de faire une extrapolation directe sur l'homme mais donne une orientation sur la suite des essais à réaliser avant cette extrapolation.

Principe

Il consiste à déterminer statistiquement la dose moyenne qui provoque la mortalité de la moitié des animaux testés.

On administre des doses qui se suivent dans un ordre croissant à plusieurs groupes de souris. Après la période d'observation, les différents taux de mortalité

pour chaque dose sont analysées pour donner une valeur statistique qui correspond à la DL₅₀.

En plus de la mortalité, d'autres signes de toxicité, tel que les vomissements, la diarrhée, l'irritation....etc, sont à noter afin d'évaluer la DL₅₀ [239].

Choix du modèle animal

Les essais de toxicité aiguë peuvent être réalisés sur des rats ou des souris [77; 203; 8].

Dans notre expérimentation, nous avons choisi de travailler sur des souris en raison de leur disponibilité. Pour cela, nous avons utilisé 48 souris de même sexe : mâles.

Distribution des lots et choix des doses

Nous avons utilisé huit lots (Sept lots d'essais et un lot témoin) contenant chacun six souris. Chaque lot va recevoir une dose d'huile essentielle dans un solvant approprié sauf le témoin qui ne recevra que le solvant. Le volume administré pour chaque souris est de 0.5 ml. Les doses ont été choisies en se basant sur les données bibliographiques. Les doses utilisées sont : 0.5 ; 0.75 ; 1 ; 1.5 ; 2 ; 3 ; 4 g d'H.E / Kg de poids vif de l'animal.

Mode opératoire

Nous avons utilisé la méthode de BERHENS et KARBBER (1949) pour sa simplicité.

Tous les essais ont été initiés le même jour avec le même matériel et dans les mêmes conditions, conditions normales d'une animalerie conventionnelle (Appendice C).

Les différentes doses d'huile essentielle ont été émulsionnées dans un solvant constitué d'eau distillée et de Tween 80. Ce dernier est un stabilisateur d'émulsions sans toxicité significative sur l'animal.

Le produit a été administré par gavage en respectant la durée recommandée de 5 secondes / souris.

Les animaux sont mis en observation pendant 14 jours, avec distribution d'aliments et d'eau ad libitum.

Lecture des résultats Le calcul de la DL 50 se fait selon la méthode de BERHENS et KARBBER, 1949:

$$DL_{50} = DL_{100} - \frac{\sum a b}{n}$$

n : Nombre moyen d'animaux par lot

b : nombre moyen des morts de deux doses successives

a : différence entre deux doses successives

Les valeurs obtenues vont être comparées avec celles fournies dans le tableau 2.3

Tableau 2.3: Classes de toxicité : échelle de HODGE et STERNER [183; 127; 77]

DI ₅₀ (orale)	Indice de Toxicité
Jusqu'à 1 mg / kg	1 : extrêmement Toxique
De 1 à 50 mg / kg	2 : hautement Toxique
De 50 à 500 mg / kg	3 : modérément Toxique
De 500 à 5000 mg / kg	4 : légèrement Toxique
De 5000 à 15000 mg / kg	5 : presque pas Toxique
Plus de 15000 mg /kg	6 : relativement inoffensif

🚩 Evaluation de la tolérance cutanée in vivo

Objet

Les tradipraticiens utilisent le Thym soit par voie orale (Extrait aqueux et huile essentielle) soit par voie cutanée (huile essentielle).

Pour cela, il est nécessaire d'estimer le degré d'irritation cutanée de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris L.*

Il s'agit d'essayer différentes doses afin de déterminer la concentration maximale limite à utiliser.

Choix des doses

Les essais ont été réalisés en partant de la dose minimale efficace (DME), déterminée dans l'essai antispasmodique : 0,0006% et en augmentant progressivement la dose jusqu'à l'HE pure (100 %) : 0,0006 %, 0,002 %, 0,02 %, 1 %, 10 %, 100 %.

Principe

L'essai est réalisé sur 03 lapins pour chaque dose, elle est inspirée d'une méthode standardisée par DRAIZE.

C'est un test de toxicité aigue (application unique du produit) des médicaments à usage topique (gel, pommade,.....).

Le système de cotation des phénomènes observés permet de dégager par un calcul un indice d'irritation primaire cutanée (IP) pour classer les produits en 4 catégories (Echelle de DRAIZE).

Choix du modèle animal

Les lapins sont les animaux les plus fréquemment utilisés pour ce test en vu de la sensibilité de leur peau [8; 239].

Nous avons utilisé 18 lapins répartis en 6 lots constitués de 3 lapins chacun. Chaque lapin va recevoir une dilution d'HE sur les deux flancs (un flanc scarifié et un non scarifié).

Protocole opératoire

- Une journée avant l'application du produit, les lapins sont tondu au niveau du dos et des deux flancs sur une surface suffisante pour appliquer le produit. Ils sont ainsi conservés pour la suite de l'essai. On utilise 3 lapins pour chaque dose d'huile essentielle.

- le jour de l'essai, on effectue sur le flanc droit à l'aide d'une lame de scalpel stérile ou d'un vaccinostyle (Voir photo en annexes), trois scarifications espacées de 0.5 cm et longues de 2 cm, le flanc gauche restant tel quel, les scarifications doivent abraser la couche cornée sans provoquer de saignements. Le but de cette scarification est d'augmenter la perméabilité de la peau à l'HE, car cette dernière diffuse très rapidement dans une peau altérée comparée à sa diffusion dans une peau saine.

- On dépose à l'aide d'une seringue de 1 ml, 0.5 ml de chaque dilution d'HE sur deux compresses stériles de 2.5 X 2.5 cm, appliquées ensuite l'une sur le flanc scarifié et l'autre sur le flanc normal. la gaze ainsi imbibée est recouverte par une bande de sparadrap perforé.

- Les lapins sont remis dans leurs cages en attendant la lecture des résultats.

Lecture

Les pansements sont enlevés vingt quatre heures plus tard et les résultats sont lus après une demi- heure. Une seconde lecture sera faite 72 heures après l'application du produit.

Les lectures consistent à apprécier l'érythème et l'œdème sur chaque flanc selon l'échelle numérique suivante [101] [8] :

Tableau 2.4: Classification des érythèmes et des œdèmes (Echelle de DRAIZE : échelle de lecture)

ERYTHEME	Pas d'érythème	0
	Léger érythème (à peine visible)	1
	Erythème bien visible	2
	Erythème important	3
	Erythème grave (rouge pourpre) avec ou sans escarres (lésions profondes)	4
OEDEME	Pas d'œdème	0
	Très léger œdème (à peine visible)	1
	Léger œdème (contours bien définis, Gonflement apparent).	2
	Œdème moyen (épaisseur environ 1 mm).	3
	Œdème grave (épaisseur supérieure à 1 mm et surface supérieure à la zone d'application).	4

Pour calculer l'indice d'irritation primaire cutanée (IP), on additionne les chiffres relevés pour l'érythème et l'œdème à chaque temps de lecture (24 h et 72 h après l'application) pour chaque dose sur les zones scarifiées d'une part et les zones non scarifiées d' autre part, puis on calcule la moyenne des résultats observés [101].

Calcul de l'indice d'irritation primaire :

- A chaque lecture, on additionne les valeurs de l'œdème et de l'érythème de chaque flanc (Scarifié et non scarifié) d'un lapin qu'on divise sur deux (deux lectures : 24 et 72 h).
- Additionner les valeurs déterminées pour les deux flancs du même lapin puis diviser par deux (moyenne par flanc).
- Calculer la moyenne pour chaque lot (trois lapins).

2.2.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* L.

2.2.4. 1. La conservation des souches microbiennes

La technique courante de conservation des souches est celle des repiquages successifs. La méthode courante utilise des tubes de milieu solide inclinés ; une fois ensemencés, les tubes sont placés à l'étuve pour que la croissance débute puis, avant qu'elle ne soit trop abondante, les tubes sont placés dans une armoire réfrigérée à 4°C [112].

2.2.4. 2. Test d'inhibition des champignons

2.2.4. 2.1. But et principe

Le but recherché est de mettre en évidence une éventuelle activité antifongique des huiles essentielles.

Le principe des manipulations est d'estimer l'inhibition de la croissance des bactéries et des champignons soumis à l'huile essentielle et à l'extrait aqueux de Thym.

La méthode utilisée est la diffusion sur milieu PDA, c'est à dire mettre au contact des huiles l'inoculum de champignon [129; 65].

2.2.4.2.2. Préparation des dilutions des huiles essentielles pour le test d'inhibition mycélienne

Pour les dilutions, on ajoute à chaque 150 ml de milieu PDA, un volume de 0,1 ml de chaque huile essentielle (0,596%, 0,39%, 0,249% et 0.05%) et quelques gouttes de tween 20 (Concentré à 2%) [115].

Les solutions sont ensuite mélangées puis versées aseptiquement dans les boîtes de pétri de 90 mm de diamètre à raison de 17 ml/boîte et avec trois répétition par dilution.

Le milieu de culture des témoins comprend :

- PDA + Ether diéthylique (1ml).
- PDA + Tween 20, la concentration étant de 2%.
- PDA pure

2.2.4. 2.3. Préparation des inoculums

Selon plusieurs auteurs, l'inoculum consiste en un prélèvement d'un fragment de 6 mm de diamètre à partir de la zone périphérique d'une culture âgée de sept (07) jours pour les champignons vrais [175 ; 75 ; 203], à l'aide d'un emporte pièce ou d'une pipette pasteur stérilisée [129 ; 175]. Une fois prélevé, l'explant est déposé au centre de la boîte de pétrie (du milieu de culture).

Pour les levures, les cultures doivent être âgées de 48 heures.

2.2.4. 2.4. Mode opératoire

Selon Deba et *al.* (2007), le milieu utilisé, lors de cette étude, est le milieu PDA (Patato Dextrose Agar). C'est un milieu très recommandé et commode pour la culture de champignons saprophytes et pathogènes. Il est caractérisé par sa clarté, ce qui facilite l'observation de la croissance des champignons en son sein (composition du PDA en appendices).

2.2.4. 2.5. L'incubation

Les boîtes de pétrie sont incubées à l'obscurité sous une température de 25°C ± 2. Les témoins sont soumis aux mêmes conditions de culture.

2.2.4. 2.6. La lecture des résultats

Elle consiste à mesurer la moyenne des diamètres de chaque colonie. L'opération est répétée à différents temps en considérant que le test s'achèvera après sept (07) jours de culture [129 ; 175 ; 203]. La concentration minimale inhibitrice (CMI) étant la plus faible concentration d'huile essentielle qui permet une inhibition visible des colonies mycéliennes [115]

2.2.4. 3. Test d'inhibition des bactéries : Aromatogramme

2.2.4.3.1. Principe de l'aromatogramme

C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des H.E. Il permet d'observer le comportement d'un germe pathogène vis-à-vis d'une H.E.

Le principe de l'aromatogramme est tout à fait identique à celui de l'antibiogramme, les H.E étant utilisées à la place des antibiotiques [39 ; 129].

2.2.4. 3.2. Préparation de l'inoculum bactérien

Les suspensions bactériennes sont préparées, à partir des pré-cultures jeunes âgées de 18 à 24 heures sur gélose nutritive à 37 ° C, dans l'eau distillée stérile, et ajustées à environ 10^8 UFC / ml par mesure de la transmission optique à 625 nm qui doit être comprise entre 0.08- 0.1 pour les bactéries exigeantes *Bacillus subtilis* et diluées au 1/10 (Correspondant à 10^7 UFC / ml) pour les bactéries non exigeantes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus* [73 ; 21].

2.2.4. 3.3. Mode opératoire

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des dilutions d'H.E. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque H.E diffuse à partir du disque au sein de la gélose et détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'huile essentielle suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies appelée zone d'inhibition [129 ; 65 ; 112]. Les étapes sont les suivantes :

- Fondre le milieu Muller Hinton à 100°C dans un bain marie.
- Laisser refroidir jusqu'à 45°C à 50°C.
- Couler les boîtes pétries à une épaisseur de 4mm.
- Laisser solidifier.
- Déverser 0.1 ml de l'inoculum bactérien et ensemençer par étalement toute la surface de la gélose à l'aide d'une pipette pasteur modifiée en râteau.
- Jeter l'excès et laisser sécher en ouvrant les boîtes pétri
- Imbiber les disques de papier stérile avec 15 µl de chaque dilution d'huiles essentielles.
- Déposer les disques à une distance minimale de 15mm du bord et 30mm entre 02 disques (si on utilise plus d'un disque)
- incubé à 37 °C pendant 24 heures (Figure 2.19) [21].

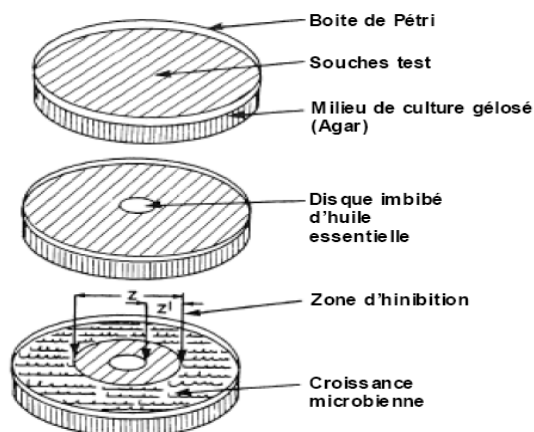


Figure 2.19 : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri.

2.2.4. 3.4. Lecture des résultats

Il se forme autour de certains disques une auréole claire et transparente circulaire à bord net, C'est le halo d'inhibition. Au delà duquel le milieu est trouble par prolifération des germes.

La lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un lecteur spéciale (Voir appendices) [21 ; 73]. La cotation se fait de 0 à 3 croix, suivant le diamètre de l'auréole dans laquelle l'huile essentielle a agit. Les résultats sont exprimés suivant le diamètre de sensibilité du germe testé [65].

- 0 Résistant.
- + Sensible : Halo d'inhibition 1 à 2 mm
- ++ Assez sensible : Halo d'inhibition 2 à 3 mm
- +++ Très sensible : Halo d'inhibition > à 3 mm [221].

2.2.5. Tests des activités biologiques de *Thymus vulgaris* L.

2.2.5. 1. Activité antioxydante (Détermination du pouvoir réducteur)

Le pouvoir réducteur mesure la capacité qu'a un antioxydant à donner un électron [17]. La détermination du pouvoir réducteur est réalisée selon la méthode de OKTAY et *al.* (2003), comme l'indique la figure 2.20.

La réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) est mesurée par l'intensité de la solution bleue vert qui en résulte. Celle-ci absorbe à une longueur d'onde de 700nm. Une augmentation de l'absorbance est indicatrice d'un pouvoir réducteur élevé [17; 268].

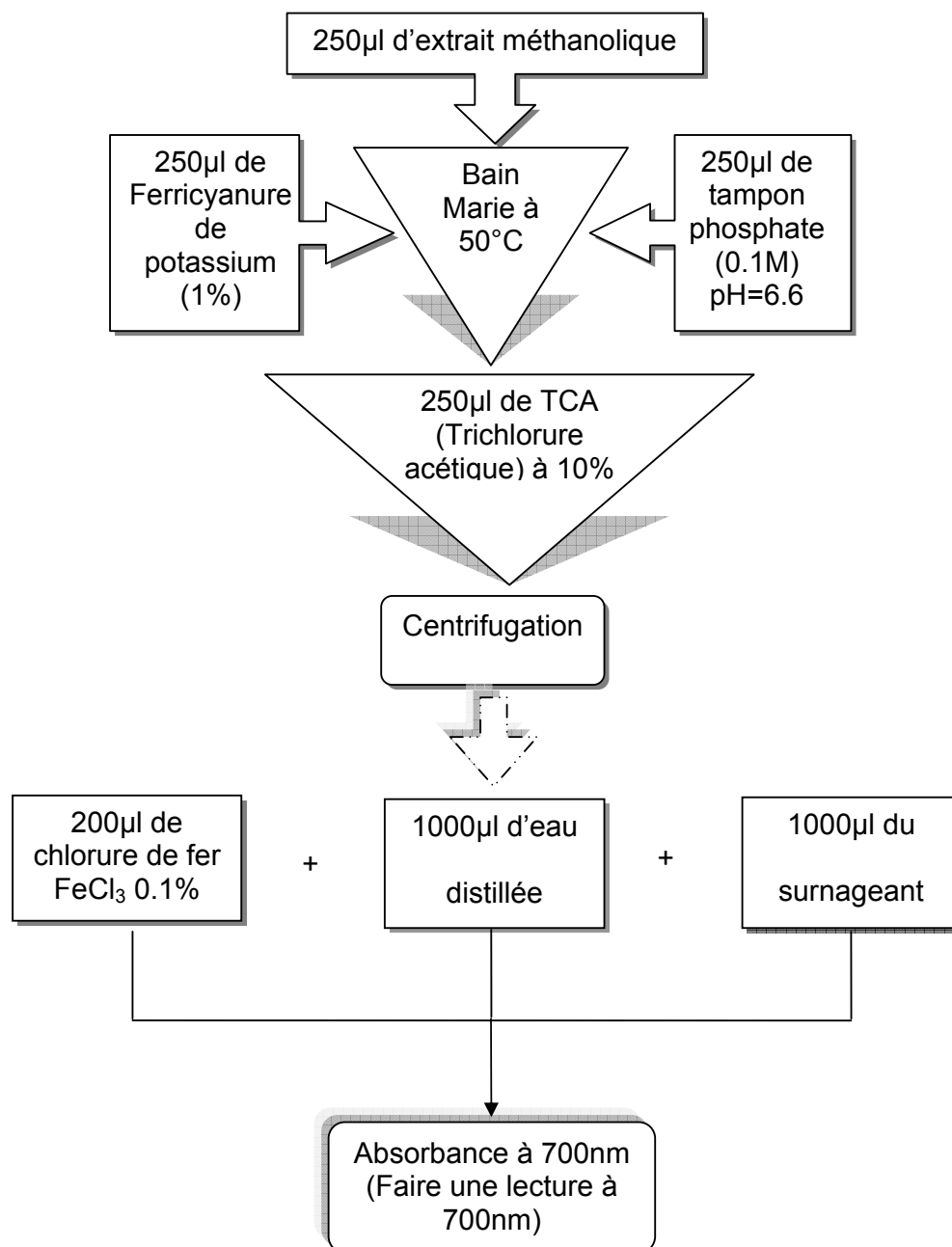


Figure 2.20 : Protocole de détermination du pouvoir réducteur OKTAY et *al.* (2003)

Le témoin est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par du méthanol.

2.2 .5. 2. Activité hypotensive

Selon BARNES et *al.* (2007), le thym, administré par voie orale ou par injection intramusculaire, aurait des effets contre l'hypertension artérielle.

2.2.5.2.1. Objet

Il s'agit de mettre en évidence l'effet hypotenseur de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris L.* administré par voie parentérale et d'apprécier son intensité en fonction du standard d'histamine.

2.2.5.2.2. Principe

L'essai des substances hypotensives (Test à l'histamine) s'effectue en comparant chez le chat, la baisse de tension artérielle provoquée par la solution à examiner avec celle que détermine l'administration d'une solution d'histamine [197].

Un transducteur de pression transforme les variations de la tension artérielle en variations d'impulsions électriques, et le chymographe (appareil enregistreur) enregistre les variations d'impulsions électriques.

2.2.5.2.3. Choix du modèle animal

Selon la pharmacopée, le chat est le modèle animal de choix pour tester l'effet hypotenseur d'une substance à usage pharmaceutique, ce dernier doit peser 2.5 kg et plus, de sexe mâle ou femelle.

2.2.5.2.4. Préparation du chat pour le test

Le chat est anesthésié au penthiobarbital de sodium (qui n'altère pas la tension artérielle) à raison de 150mg /kg par voie intrapéritonéale. Une fois anesthésié, le chat est allongé en décubitus dorsal sur une table thermorégulée à 37 °C.

La mâchoire et les pattes sont immobilisées par un mors et des liens.

Après rasage du cou, une incision longitudinale met à nu la trachée sur laquelle on fait une incision jusqu'à mi-diamètre. On introduit une canule en plastique dure qui favorisera une meilleure respiration, cette trachéotomie est nécessaire suite aux catharres occasionnés par l'anesthésie (qui provoque une augmentation des sécrétions de la trachée qui gênent la respiration du chat). Puis on isole chirurgicalement l'artère carotide gauche ou droite et on veille à la séparer des structures adjacentes, surtout du nerf vague qu'il ne faut surtout pas couper.

La carotide est à son tour canulée en introduisant un tube fin contenant de l'eau physiologique héparinée à contre courant du sang circulant. Les canules trachéale et carotidienne sont ligaturées pour les fixer et éviter une hémorragie.

La canule carotidienne est reliée par son autre extrémité à un dispositif transducteur de pression artérielle (transforme les pulsations mécaniques du sang en impulsions électriques détectables par l'appareil enregistreur), le transducteur est lui-même relié au chymographe.

L'une des pattes postérieures est rasée sur la face interne de la cuisse. De la même façon que la carotide, la veine fémorale est isolée, canulée et reliée à une seringue qui servira à injecter les solutions à tester [197].

2.2.5.2.5. Préparation du chymographe (étalonnage)

L'étalonnage du chymographe doit être réalisé avant l'essai.

L'appareil enregistreur de tension artérielle (chymographe) est du type Unirecord 7050 (UGO BASILE).

A l'aide d'un manomètre à mercure, on étalonne l'appareil enregistreur en utilisant le transducteur de pression de telle façon à faire correspondre 1 cm sur le graphe à 10 millimètre de mercure (mm Hg) de pression en manipulant le bouton de sensibilités.

2.2.5.2.6. Préparation des solutions

2.2.5.2.6.1. Pentobarbital de sodium

Préparation à partir de pentobarbital en poudre d'une solution salée isotonique contenant 150mg/ml, le chat va recevoir 1 ml/kg par voie intrapéritonéale.

2.2.5.2.6.1. Solution d'histamine chlorhydrate (ou chlore hydrate)

Préparation de trois solutions de concentrations correspondant à 0.05 µg/ml (0.05 δ), 0.1 δ, 0.15 δ d'histamine base. Cette dernière ne peut être injectée directement car elle n'est pas soluble, pour la dissoudre on utilise un acide (Acide chlorydrique), sachant que 1 mg d'histamine base équivaut en activité à 1,65 mg d'histamine chlorhydrate; Cette dernière est donc utilisée préférentiellement à l'histamine base pour des raisons de solubilité et de stabilité ;

Le chat recevra 1 ml /kg à travers la veine fémorale.

2.2.5.2.6.1. Extrait aqueux

Préparation d'une solution concentrée de poudre de Thym à 10 % (solution mère) à partir de laquelle on réalise des dilutions. Les facteurs de dilutions étant les suivants : 1/2, 1/5, 1/10, 1/15.

Injection de 1 ml /kg à travers la veine fémorale.

2.2.5.2.7. Protocole expérimentale

2.2.5.2.7.1. Détermination de la sensibilité de l'animal à l'histamine

Suite au traumatisme opératoire, la tension artérielle peut être instable au début, il faut donc attendre que celle-là soit tout à fait stable. Pour cela, on alterne à 5 minutes d'intervalle les trois concentrations d'histamine (0.05 δ – 0.1 δ et 0.15 δ). Il faut également s'assurer qu'il y a une proportionnalité entre ces concentrations et les chutes de tension provoquées. Si ce n'est pas le cas, refaire après quelques instants jusqu'à y arriver. Terminer alors par 0,1 δ qui nous servira de référence (Figure 2.21).

2.2.5.2.7.2. Réalisation de l'essai

Cinq minutes après, On injecte le produit à contrôler et on observe le résultat 5 min plus tard. On reprend l'Histamine à 0.1 δ , puis après 5 min encore, on teste la nouvelle concentration du produit. On procède de la même façon pour la suite des essais en intercalant à chaque fois 0,1 δ d'Histamine entre deux doses d'échantillon afin de nous assurer que le chat continue à répondre avec la même sensibilité aux stimuli hypotenseurs [197].

En cas d'utilisation de la même canule pour les deux solutions, chaque injection de ces solutions devra être immédiatement suivie d'une injection de 2 ml d'eau physiologique NaCl à 0.9 % pour chasser tout résidu de la canule.

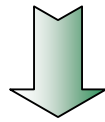
2.2.5.2.8. Lecture des résultats

La tension artérielle est caractérisée par deux valeurs : la tension systolique « S » (Tension maximale) et la tension diastolique « D » (Tension minimale). Une chute de tension se manifeste sur le chymogramme (le graphe) par l'apparition de pics descendants, représentant la diminution des valeurs des tensions systoliques et diastoliques, suite aux injections de substances hypotensives.

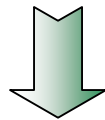
Sachant que, suite à l'étalonnage de l'appareil, 1 cm sur le chymogramme correspond à 1 cm de mercure. La lecture des variations de tension est donc directe.

On peut suivre séparément les tensions systolique et diastolique, mesurer le temps de latence entre l'injection et la réponse, le délai et l'intensité de la réaction de l'organisme. On peut aussi mesurer le pouls ainsi que d'autres paramètres.

Déclencher le système enregistreur et évaluer la stabilité de la tension artérielle de l'animal.



Injecter dans la fémorale les solutions étalons d'histamine à raison de : 0,05 δ / Kg, 0,1 δ / Kg, 0,15 δ / Kg.



Répéter cette série d'injections jusqu'à ce que la tension artérielle présente une diminution relativement proportionnelle aux doses d'histamine après injection, et relativement uniforme pour la dose 0,1 δ .

L'animal est admis si :

1. La diminution de la tension artérielle après injection des doses 0,1 δ d'histamine n'est pas inférieure à 20 mm Hg.
2. La dose 0,05 δ d'histamine provoque une baisse inférieure à celle des doses 0,1 δ .
3. La dose 0,15 δ provoque une chute de tension supérieure à celle des doses 0,1 δ .

Figure 2.21 : Les étapes de la détermination de la sensibilité de l'animal à l'histamine.

2.2.5. 3. Effet antipyrétique

Selon BARNES et *al.* (2007) et l'organisation mondiale de la santé de Genève (1999), Le Thym aurait des propriétés antipyrétiques.

2.2.5. 3. 1. Choix du modèle animal

Le lapin est l'animal qui répond le mieux aux substances pyrogènes par une élévation de sa température corporelle.

De plus , sa disponibilité , son élevage relativement facile , la facilité de manipulation (injection , mesure de température rectale) en font le modèle de choix , d'ailleurs exigé par toutes les pharmacopées .

2.2.5. 3. 2. Les essais

L'essai recommandé par la pharmacopée européenne version 2007 consiste en deux étapes indispensables :

- Un essai préliminaire pour sélectionner les lapins aptes au test proprement dit.
- L'essai définitif qui met en évidence l'effet pyrogène ou antipyrétique d'une substance administrée par voie parentérale.

2.2.5. 3. 2.1. Essai préliminaire

✓ **But :**

Le lapin est de nature craintif et sensible à toute forme de stress. Sa réaction peut se manifester par une élévation importante de sa température corporelle [197].

Les animaux trop sensibles et ceux qui ont une température anormale (en dehors de la fourchette 38. 0 °C et 39.8 °C) , ou instable variant de plus de 0.5 °C ($\Delta T^{\circ} > 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) sont éliminés du test .

✓ **Principe**

Il consiste à comparer la température corporelle moyenne des lapins à l'état initial et la température des mêmes lapins après injection en intra-veineux d'eau physiologique stérile et apyrogène au cours des 3 heures qui suivent son administration.

Si un lapin montre une élévation supérieure ou égale à 0.5°C, elle ne peut être due qu'à sa réaction au traumatisme manipulatoire. Ce lapin ne répond donc pas aux exigences de la pharmacopée pour l'essai proprement dit. Il doit être écarté de l'essai [87].

✓ **Mode opératoire et lecture des résultats**

➤ Choisir des lapins dont le poids est \geq 1800 g et l'état sanitaire satisfaisant. Les femelles ne doivent pas être gestantes ni allaitantes.

➤ La veille de l'essai, les lapins sont mis à jeun mais sans les priver d'eau pour prévenir l'expulsion des sondes rectales par l'émission de crottes.

➤ Le lendemain matin, les animaux sont transportés dans la salle de contrôle des pyrogènes où règnent des conditions d'ambiance identiques à celle du stabularium. Après les pesées et les enregistrements nécessaires au suivi du test et à la traçabilité, ils sont mis sur des tables dans des boîtes à contention pour les immobiliser durant l'essai, dans des conditions non stressantes.

➤ Des sondes thermométriques numérotées sont induites d'huile de vaseline, puis introduites dans le rectum des lapins à une profondeur suffisante (7 cm). L'autre extrémité de ces sondes qui passe dans un trou à travers le mur, est reliée à un appareil enregistreur de température dans le local voisin (l'opérateur ne doit pas perturber le confort et le calme des lapins au risque d'influer sur les résultats d'analyse).

➤ Mise en marche de l'enregistreur de température pendant 105 min puis l'arrêter.

➤ Lire le thermogramme continu et noter dans le document de suivi de l'essai les températures de chaque lapin à 75 min et à 105 min puis la moyenne entre les deux valeurs dans la case « Température moyenne » (Voir tableau 3 appendice F).

➤ Sélectionner ceux dont les températures sont comprises entre 38.0 et 39.8 °C.

➤ Après désinfection à l'alcool chirurgical, injecter à chaque animal sélectionné 10 ml d'eau physiologique stérile et apyrogène, chauffée au bain marie à 38 °C, à travers la veine marginale de l'oreille (Figure 9 appendice F). Procéder de façon à limiter au maximum le stress causé aux lapins. Après 5 min de repos, relancer l'enregistrement de la température en continu durant 3 heures.

➤ Arrêter l'appareil, retirer les sondes rectales et remettre les lapins dans leurs cages respectives avec eau et aliment ad libitum.

➤ Lire les températures maximales atteintes par chaque individu durant les 3 heures de l'essai et les porter sur le document de suivi dans la case « Température maximale ». La différence entre la température maximale et la température moyenne (à 0.1 °C près) est portée dans la case « variation de température » (Voir tableau 3 appendice F).

➤ Les lapins dont l'élévation de température est ≥ 0.5 °C seront réformés. Ceux dont la température est < 0.5 °C sont validés pour le test définitif. Ils doivent se reposer pendant 1 ou 2 jours et seront réutilisés pour le test proprement dit le deuxième ou le troisième jour.

2.2.5. 3. 2.2. Essai proprement dit

✓ Choix des échantillons, des doses et des essais

L'éventuel effet antipyrétique pourrait être dû aussi bien à l'H .E qu'à l'extrait aqueux; Pour cette raison, les deux solutions ont été contrôlées.

L'effet pyrogène à été induit par des endotoxines de E.coli 055 : B5 (fournis par le laboratoire Bio-Whitaker.Maryland USA.Lot 2008). (Voir figure 12 appendice F)

A défaut de références bibliographiques, le choix de la dose de l'H.E a été inspiré des résultats de la dose efficace obtenue au cours de l'essai antispasmodique. Quant à l'extrait aqueux, les résultats de l'effet hypotensif ont servis de base de calcul.

Ces doses sont donc : 0,002 ml d'H.E /ml de solution (le solvant utilisé est l'huile de tournesol à cause de sa neutralité, d'ailleurs, il sera contrôlé à son tour).

Pour l'extrait aqueux, une dose simple (2.5 g/ 100 ml) et une dose double (5 g/ 100 ml) ont été utilisées. Elles consistent en une infusion de poudre de Thym dans de l'eau pendant 10 minutes suivie d'une filtration stérilisante à l'aide d'un filtre absolu à 0.22 µm de porosité.

L'utilisation de paracétamol servira de référence.

La dose d'endotoxine utilisée est de 5 EU (Endotoxine Unit) /Kg de poids vif de l'animal, dose minimale nécessaire pour provoquer de la fièvre chez l'homme [196].

Le lapin étant plus sensible aux endotoxines que l'homme, cette dose s'avère donc largement suffisante [196].

Les différents essais sont décrits dans le tableau 2.5:

Tableau 2.5: Distribution des lots de lapins selon le produit administré et la dose :

N° du Lot	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Essai	Endotoxine seule. (Témoin négatif)	Paracétamol injectable + Endotoxine.	Eau physiologique. (Essai à blanc)	Extrait aqueux dose simple + Endotoxine.	Extrait aqueux dose double + Endotoxine.	Huile essentielle + Endotoxine.	Extrait aqueux dose simple seule.	Extrait aqueux dose double seule.	Huile essentielle
Dose	5 EU/ml d'eau	5 EU / ml + paracétamol à 10 mg / ml.	0.9%	5 EU / ml + E.A à 2.5 %	5 EU / ml + E.A à 5 %	5 EU / ml + l'H.E à 0.2 %	2.5 %	5 %	0.2 %

E.A : Extrait aqueux.

EU : Unité d'endotoxine.

H.E : Huile essentielle.

Le volume injecté est de 1 ml / Kg pour tous les essais. C'est la voie intraveineuse qui est exigée par la pharmacopée pour toutes les solutions aqueuses. Les solutions huileuses sont administrées en intramusculaire.

✓ **But**

C'est la mise en évidence de l'effet antipyrétique de l'extrait doué de cette propriété, de la dose efficace, et de la relation dose - effet.

✓ **Principe**

Il consiste à injecter aux lapins une dose d'endotoxine capable à elle seule de provoquer une hyperthermie supérieure à la limite tolérée (0.5 °C). L'administration simultanée de notre échantillon limitera cette élévation de la température s'il est censé être doté de propriété antipyrétique [87].

✓ **Mode opératoire**

C'est exactement le même que pour le test de sélection. Les différences sont :

- Après le relevé de la température moyenne, les lapins répondant aux normes sont répartis en lots de 3 individus chacun ; les lapins ayant des températures voisines sont mis dans le même lot.
- Injecter l'échantillon, le mélange d'échantillons ou l'endotoxine seule (témoin positif) à raison de 1 ml /kg poids vif et ce aux trois lapins du même lot.

✓ **Lecture des résultats**

A la fin de l'essai, après lecture et enregistrement des élévations de température, les résultats seront interprétés comme étant la somme des élévations de température des trois lapins du même lot est prise comme valeur, la comparaison entre les différents lots renseignera sur un éventuel effet antipyrétique.

2.2.5. 4. Recherche des endotoxines bactériennes (Le LAL test)

Les résultats de l'étude de l'activité antipyrétique ont laissé planer un doute sur l'effet pyrétogène des échantillons analysés (huile essentielle et extrait aqueux) eux même, ou la présence d'une contamination endotoxinique des

échantillons. Ces résultats nous mènent à réaliser un test supplémentaire afin de lever le doute sur une probable contamination des échantillons par l'endotoxine, ce test est appelé le LAL test.

2.2.5. 4. 1. But

Il consiste à rechercher et détecter des endotoxines de bactéries Gram négatif, même à très faible concentration dans des solutions aqueuses [87].

2.2.5. 4. 2. Principe

Cet essai utilise un réactif provenant d'un lysat d'amoebocytes (Figure 12 appendice F) issues du milieu intérieur d'un Limule, *Limulus polyphemus* (Figure 13 appendice F). Le mélange de ce réactif avec des endotoxines conduit à une formation de gel (Figure 2.22) [194 ; 87].

L'appellation LAL représente les initiales de Lysat d'Amoebocyte de Limule.

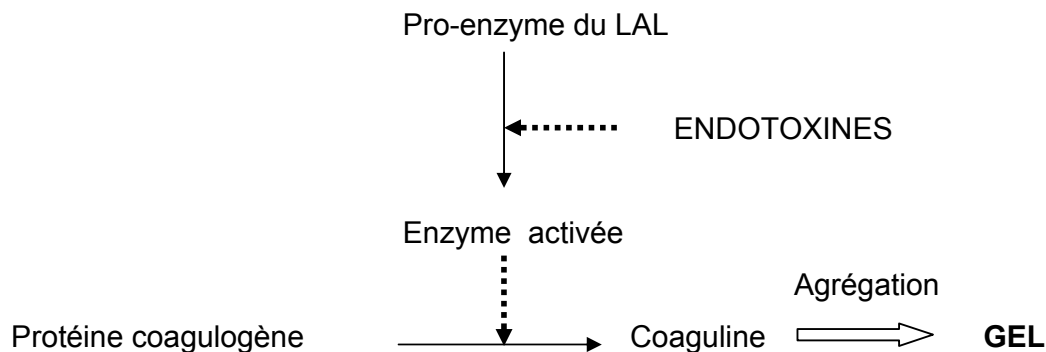


Figure 2.22: Schéma réactionnel de la formation du gel selon la Pharmacopée européenne (2001).

2.2.5. 4. 3. Préparation des solutions

2.2.5. 4. 3.1. Préparation des solutions d'endotoxine

- Le lapin voit sa température augmenter sensiblement à 5 unités d'endotoxine / ml (5 EU / ml).
- Le réactif LAL utilisé est sensible à $\lambda = 0.125$ EU / ml.

- Pour un éventuel contrôle d'inhibition (Au cas où des substances inhibitrices empêcheraient la réaction LAL-Endotoxine), une concentration de 10λ est nécessaire.

Les différentes dilutions d'endotoxine sont réalisées dans des conditions telles que la précision ne soit pas être faussée par une contamination supplémentaire en endotoxine.

D'une dilution à la suivante il faut agiter les solutions d'endotoxine au vortex et au moins pendant 1 minute afin de désorber l'endotoxine fortement adsorbée par la surface des contenants successifs (tubes, pipettes...etc) [87].

2.2.5. 4. 3.2. Reconstitution de la solution du réactif LAL

En respectant le volume indiqué sur l'étiquette, diluer le réactif lyophilisé à l'aide d'eau LAL (Eau extra pure garantie renfermant moins de 1/10 ème de la sensibilité du LAL en endotoxine).Travailler dans des conditions de propreté qui évitent tout risque de contamination endotoxinique.

2.2.5. 4. 4. Mode opératoire

L'essai consiste à associer dans un tube à incubation 0.1 ml de réactif LAL et 0.1 ml d'échantillon à contrôler. Le PH du mélange doit être compris entre 6 et 8. L'incubation à $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ dure 60 min \pm 1 min.

Toutefois, un certain nombre d'interférences sont susceptibles de fausser le résultat. Il faut donc éliminer ces interférences par des essais appropriés telles que :

- La validation de la sensibilité du LAL (Contrôle positif).
- La vérification de l'absence de contamination extérieure (Contrôle négatif) (Voir figure 2.23).

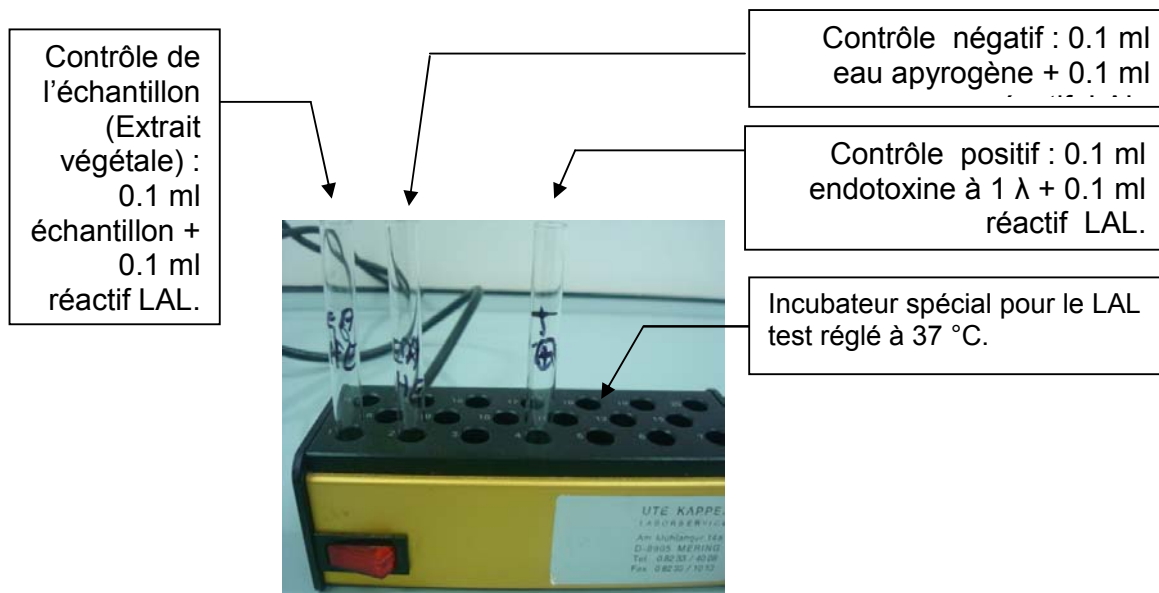


Figure 2.23 : Recherche d'endotoxine dans les extraits végétaux par le LAL test en présence de témoins positif et négatif (Originale, 2009).

2.2.5. 4. 5. Lecture des résultats

La lecture se fait par retournement de manière délicate du tube à 180 °C.

La persistance du mélange gélifié au fond du tube correspond à un résultat positif (Présence d'endotoxine \geq à la sensibilité du LAL) (Voir figure 2.24).

L'écoulement du mélange non gélifié correspond à un résultat négatif (Quantité d'endotoxine inférieure à la sensibilité du LAL) (Voir figure 2.25) [87].



Figure 2.24 : Réaction positive du LAL test (Originale, 2009).



Figure 2.25 : Réaction négative du LAL test (Originale, 2009).

Un résultat négatif de l'échantillon peut s'interpréter soit par une absence d'endotoxine ou bien par une présence d'inhibiteur de la réaction endotoxine –LAL même si cet échantillon renferme de l'endotoxine.

La vérification de l'absence d'inhibition du LAL par un composant de l'échantillon à analyser, se fait par une méthode qui consiste à surcharger volontairement l'échantillon avec de l'endotoxine, à une concentration suffisante pour réagir avec le LAL. Si malgré tout, le résultat est toujours négatif, cela constitue une preuve que l'échantillon renferme au moins une substance inhibitrice de la réaction de gélification du LAL (mais n'ayant pas nécessairement un effet sur l'action pyrétogène de l'endotoxine).

2.2.5. 5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

2.2.5. 5. 1. But

Selon ISMAILIA *et al.* (2004) et JUHAS *et al.* (2008), le Thym serait doué d'activité anti-inflammatoire. Cette dernière sera mise en évidence par les essais à huile essentielle et extrait aqueux. Ces essais seront réalisés séparément ce qui permettra d'orienter leur effet.

2.2.5. 5. 2. Principe

L'inflammation de la patte du rat provoquée par injection locale de carraghénine à 1% peut être réduite par application de substances anti-inflammatoires.

Cette inflammation est la conséquence de l'augmentation de la perméabilité vasculaire qui est à l'origine de l'œdème suite à une diffusion liquidienne dans les tissus voisins.

Le rôle du produit anti-inflammatoire est la limitation de la perméabilité vasculaire.

2.2.5. 5. 3. Choix du modèle animal

Dans la plupart des publications, c'est le rat WISTAR qui est utilisé pour cet essai [203]. La disponibilité de cet animal et la facilité de manipulation en font le modèle de choix.

2.2.5. 5. 4. Choix des essais

La mise en évidence de l'effet anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode de LEVY en 1969. Certaines étapes ont été complétées afin d'avoir le maximum de détails, en l'occurrence :

- Effet pro inflammatoire de la carraghénine en comparaison avec l'eau physiologique.
- Effet anti-inflammatoire des produits testés par rapport aux témoins (Eau physiologique et huile de tournesol).
- Comparaison avec un anti-inflammatoire officinal : Le Diclofenac de sodium.
- Etudes séparées des effets de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle suivis de comparaisons.
- Etablir une corrélation entre la dose et l'effet.
- Pharmacocinétique des effets de chaque composé et de chaque dose.
- Influence de la voie d'administration utilisée pour chaque composé testé.

2.2.5. 5. 5. Choix des doses

2.2.5. 5. 5.1. L'huile essentielle

Selon les résultats des essais de la toxicité aiguë de l'huile essentielle, la dose maximale qui n'a donné aucune mortalité est de 0.5 g d'HE / Kg de poids vif de l'animal. Afin d'avoir une marge de sécurité suffisante, cette dose a été divisée par 2.5, soit 0.2 g d'HE / Kg. Les rats utilisés de poids moyen de 190 g vont recevoir la dose : $(0.2 \text{ g} \times 190 \text{ g} / 1000 \text{ g}) = 3.8 \times 10^{-2} \text{ g}$ d'HE par rat. En volume, cela correspond à $(3.8 \times 10^{-2} \text{ g} / 0.928 \text{ g/ml}) = 0.04 \text{ ml}$ d'HE par rat. Chaque rat recevra 1 ml de solution qui contient 0.04 ml d'HE pour constituer la dose maximale à tester (4.4 %), le dixième de cette dose (0.44 %) va constituer la dose minimale à tester.

2.2.5. 5. 5.1. L'extrait aqueux

Pour l'effet antispasmodique, l'extrait aqueux a été plus efficace que l'HE. Il se peut qu'il en soit de même pour l'effet anti-inflammatoire. Ce qui nous a amené à choisir arbitrairement une dose 5 à 6 fois inférieur à la quantité de poudre renfermant la dose maximale d'HE testée qui est de : $(3.8 \times 10^{-2} \text{ g d'HE} \times 100 \text{ g de poudre végétale}) / 2.916 \text{ g d'HE} = 1.3 \text{ g}$ de poudre par ml d'eau ; cette valeur d'extrait aqueux choisie est de 0.22 g/ml. Pour compléter les essais, d'autres doses (0.075 g/ml et 0.15 g/ml) ont été testés.

La répartition des lots est représentée dans le tableau 2.6.

Tableau 2.6: La répartition des lots pour le test de l'effet anti-inflammatoire.

Désignation Des lots	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nature du Produit	Huile essentielle			Extrait aqueux				Témoins			
								EP	EP	HT	Diclofenac
Dose	0.44 %	4.4 %	0.44%	0.075 g/ml	0.15 g/ml	0.22 g/ml	0.075 g/ml	-	-	-	0.2 mg/ml
Voie d'administration des produits	Voie orale		Application locale	Voie orale			ISP	Voie orale			

EP : Eau physiologique, HT : Huile de tournesol, ISP : Injection en Sous plantaire.

Chaque rat a reçu 1 ml du produit à tester par voie orale, 0.1 ml de carraghénine à 1% ou d'eau physiologique par injection en sous plantaire.

Les rats du lot n° 3 ont reçu une application locale de l'HE diluée.

Les rats du lot n° 7 ont reçu 0.1 ml du produit supposé doté d'activité anti-inflammatoire par voie sous plantaire (Extrait aqueux 0.075 g/ml (2 ml) + 20 mg de carraghénine).

Les rats du lot n° 8 ont reçu 1 ml d'EP par voie orale et 0.1 ml d'EP en ISP à la place de la carraghénine.

2.2.5. 5. 6. Mode opératoire et lecture des résultats

Une heure après administration du traitement, on injecte la carraghénine à 1%, dans l'eau physiologique, sous la peau de la plante de la patte postérieure du rat. Les animaux sont gardés dans des conditions de stabulation habituelles au cours de l'expérience.

La mesure du volume de la patte avant, pendant et à l'issue de l'inflammation locale se fait habituellement à l'aide d'un pléthysmomètre [203], Ne disposant pas de cet appareil, un pied à coulisse précis au 1/50 ème de millimètre a été utilisé.

Les mesures sont faites au niveau de l'articulation tarso-métatarsienne des pattes postérieures des rats, dans le sens antéropostérieur. Elles sont faites dans l'ordre suivant :

- Epaisseur initiale des pattes.

- Une mesure immédiatement après injection de carraghénine ou eau physiologique, pour tenir compte de l'enflément dû au volume injecté.
- Des mesures toute les 30 minutes pour suivre l'évolution de l'inflammation jusqu'à 210 minutes.

2.2.5.6. Activité antispasmodique

Selon plusieurs auteurs, Le Thym aurait des propriétés antispasmodiques [271; 130; 19; 145].

2.2.5.6.1. But

La mise en évidence de l'effet réducteur de spasmes provoqués par l'acide acétique, chez *Thymus vulgaris* L.

2.2.5.6.2. Principe

L'injection d'acide acétique à 1% par voie intra- péritonéale provoque chez la souris une réaction douloureuse, cette douleur se manifeste par des spasmes sous forme de mouvements de torsion de l'abdomen avec étirement des pattes postérieures. Une substance antispasmodique à la dose active réduit le nombre de ces spasmes [203].

2.2.5.6.3. Choix du modèle animal

Pour la réalisation de cette expérience, il est recommandé d'utiliser des souris [203]. Il a fallu 21 lots de six souris chacun. Chaque lot est formé de trois souris mâles et trois femelles (répartition homogène des sexes) [203].

2.2.5.6.4. Choix des essais

La mise en évidence de l'effet anti-spasmodique a été réalisée selon la méthode de RAHMAN et *al.* (2005). Certaines étapes ont été complétées afin d'avoir le maximum de détails, en l'occurrence :

- Les témoins ont été choisis afin de montrer l'effet neutre de l'eau physiologique et du diluant de l'huile essentielle (Huile de tournesol) sur la réduction ou la provocation des spasmes chez les souris.
- Effet antispasmodique des produits testés par rapport aux témoins (Eau physiologique et huile de tournesol).

- Comparaison avec un antispasmodique officinal : Le Spasfon.
- Etudes séparées des effets de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle suivies de comparaisons.
- Etablir une corrélation entre la dose et l'effet.

2.2.5.6.5. Choix des doses

2.2.5.6.5.1. L'huile essentielle

Selon les résultats des essais de la toxicité aiguë de l'huile essentielle, la dose maximale qui n'a donné aucune mortalité est de 0.5 g d'HE / Kg de poids vif de l'animal. Afin de rester assez éloigné de la dose toxique, nous prenons comme dose maximale d'essai le dixième de la dose ci-dessus, donc 0.05 g /Kg. Les souris utilisées ayant un poids moyen de 20 g par individu, la dose par souris est de 1 mg d'HE /souris de 20 g. Puisque chaque souris a reçu 0.5 ml, la plus forte concentration de travail est de 1 ml x 1 ml / 0.5 ml donc 2 ml / ml. La masse volumique de l'HE étant de 0.928 g/ml, le pourcentage d'HE par rapport au solvant est de : $(2 \text{ mg d'HE} / 0.928) / \text{ml de solvant} = 2.15 \cdot 10^{-3} \text{ ml} / \text{ml de solvant}$ donc 0.215 %. Afin de simplifier les calculs, on arrondit à 0.2 %. Les différentes doses essayées sont : 0.0006 %, 0.002 %, 0.02%, 0.1% et 0.2%.

2.2.5.6.5.2. L'extrait aqueux

Toujours pour respecter la plus forte dose qui ne doit pas dépasser le 1/10 ème de la dose maximale qui ne donne pas d'effet toxique, la dose maximale d'extrait aqueux ne doit pas renfermer plus de 2 mg d'HE / ml d'EA. Puisque le rendement en HE est de 2.91 %, la quantité de poudre de Thym par volume d'eau est de : $(100 \text{ g} \times 2 \text{ mg} / 2.91 \text{ g}) = 6.87 \times 10^{-2} \text{ g} / \text{ml}$. Comme la durée de préparation de l'infusion est faible (10 min) par rapport à la durée de l'extraction de la totalité de l'HE, il est permis de doubler carrément la concentration de l'extrait aqueux tout en restant dans les limites raisonnables d'innocuité. Les concentrations étudiées sont : 0.1125×10^{-3} , 0.225×10^{-3} , 0.45×10^{-3} , 1.37×10^{-3} , 2.7×10^{-3} , 1.37×10^{-2} , 2.7×10^{-2} , 1.37×10^{-1} g/ml.

2.2.5.6.6. Protocole expérimental

La solution antispasmodique a été injectée par voie intra- péritonéale, à raison de 0,5 ml /souris suivie 30 minutes après par l'administration de 0,2 ml d'acide acétique par injection en intra péritonéale [203].

La répartition des lots est faite selon le tableau 2.7 :

Tableau 2.7 : Répartition des lots.

	N° lot	Essais	Objectifs
Témoins	1	Huile de tournesol puis acide acétique	Absence d'activité antispasmodique du solvant.
	2	Solution physiologique puis acide acétique.	Vérification de l'activité spasmodique de l'acide acétique
	3	Huile de tournesol puis solution physiologique.	Absence d'activité spasmodique de l'huile de tournesol.
	4	Huile essentielle (0,8 %) puis solution physiologique.	Absence d'activité spasmodique de l'huile essentielle de Thym.
	5	Solution de spasfon à 0,216 % puis acide acétique.	Vérification de l'effet d'un antispasmodique de référence.
Essais de l'huile essentielle	6	HE à 0,0002 % puis acide acétique	Mise en évidence de l'activité antispasmodique et de la relation entre la dose et l'effet.
	7	HE à 0,0006 % puis acide acétique	
	8	HE à 0,002 % puis acide acétique	
	9	HE à 0,02 % puis acide acétique	
	10	HE à 0,1 % puis acide acétique	
	11	HE à 0,2 % puis acide acétique	
Essais de l'Extrait Aqueux	12	EA 0.1125×10^{-3} g/ ml (1/1200) puis acide acétique.	
	13	EA 0.225×10^{-3} g/ ml (1/600) puis acide acétique	
	14	EA 0.45×10^{-3} g/ ml (1/300) puis acide acétique.	
	15	EA $1,37 \times 10^{-3}$ g/ ml (1/100) puis acide acétique	
	16	EA $2,71 \times 10^{-3}$ g/ ml (1/50) puis acide acétique	
	17	EA $1,37 \times 10^{-2}$ g/ ml (1/10) puis acide acétique	
	18	EA $2,71 \times 10^{-2}$ g/ ml (1/5) puis acide acétique	
	19	EA $1,37 \times 10^{-1}$ g/ ml (1/1) puis acide acétique	

Les essais ont concerné aussi bien l'huile essentielle de la plante que l'extrait aqueux afin de déterminer la phase renfermant le ou les principes actifs responsables de cet effet.

2.2.5.6.7. Lecture des résultats

Cinq minutes après l'injection de l'acide acétique, le nombre de crampes a été comptabilisé durant 10 minutes [203].

2.2.6. Analyse statistique

Les résultats ont été soumis aux tests de l'analyse de la variance, à deux critères de classification, les critères quantitatifs : Pourcentage de l'œdème ou la variation de la température, et les critères qualitatifs : Temps, dose du produit administré, blocs. Les traitements sont réalisés également à l'aide du test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5% du logiciel StatiTCF 1991 de l'Institut des Techniques de Cultures Fourragères de France.

L'analyse de variance donne une estimation du degré de signification de la différence entre les échantillons étudiés en calculant la probabilité (P) pour que les échantillons soit semblables ; quatre cas peuvent se présenter :

- Si $P > 0.05$: la différence entre les échantillons est non significative.
- Si $0.01 < P \leq 0.05$: la différence est significative.
- Si $0.001 < P \leq 0.01$: la différence est hautement significative.
- Si $P \leq 0.001$: la différence est très hautement significative.

Le test de NEWMAN et KEULS permet de classer les échantillons en groupes homogènes en comparant les moyennes. Lorsque la différence entre les moyennes des lots est supérieure ou égale à la valeur de la plus petite amplitude significative (PPAS), ces échantillons n'appartiennent pas au même groupe homogène.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats de l'étude botanique de la plante

Les observations macroscopiques et microscopiques qui ont permis l'identification de *T. vulgaris* L. font ressortir les résultats suivants :

3.1.1. La fleur

L'analyse macroscopique nous a permis d'établir le diagramme floral (Figure 3.1), cette observation fait ressortir que c'est une fleur zygomorphe (Irrégulière ou à symétrie bilatérale) et hermaphrodite (Bisexuée) (Figure 3.2).

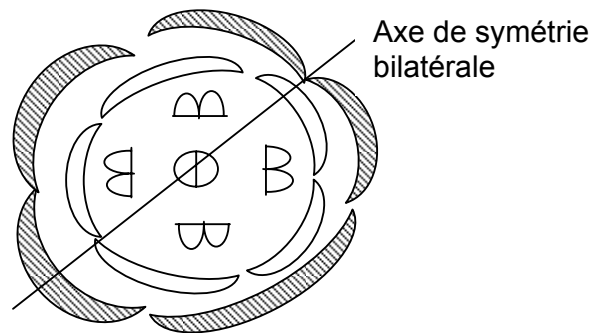


Figure 3.1: Diagramme florale de la fleur de *T.vulgaris* L. Formule florale : 5 S + 5 P + 4 E + 2 C.

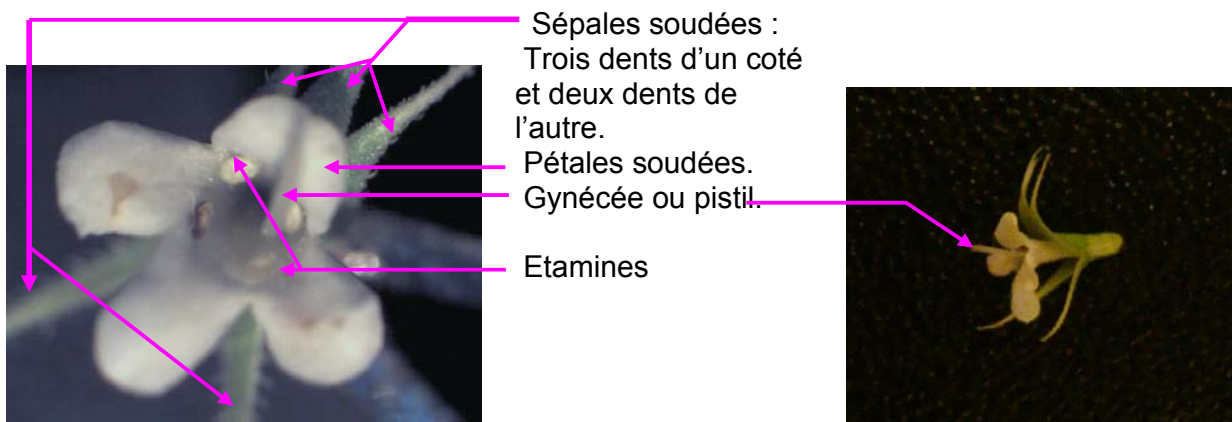


Figure 3.2: Fleur hermaphrodite zygomorphe (Originale, 2009).

Le périanthe est formé de deux cercles correspondant au calice à deux lèvres (cinq dents) et à la corolle bilabée (cinq pétales soudés) à pigmentation blanche. Les deux étant recouverts sur les deux faces externes et internes par les poils sécréteurs des huiles essentielles pluricellulaires glanduleux et les poils técteurs bicellulaires ou unicellulaires (Figures 3.3, 3.4, 3.5).

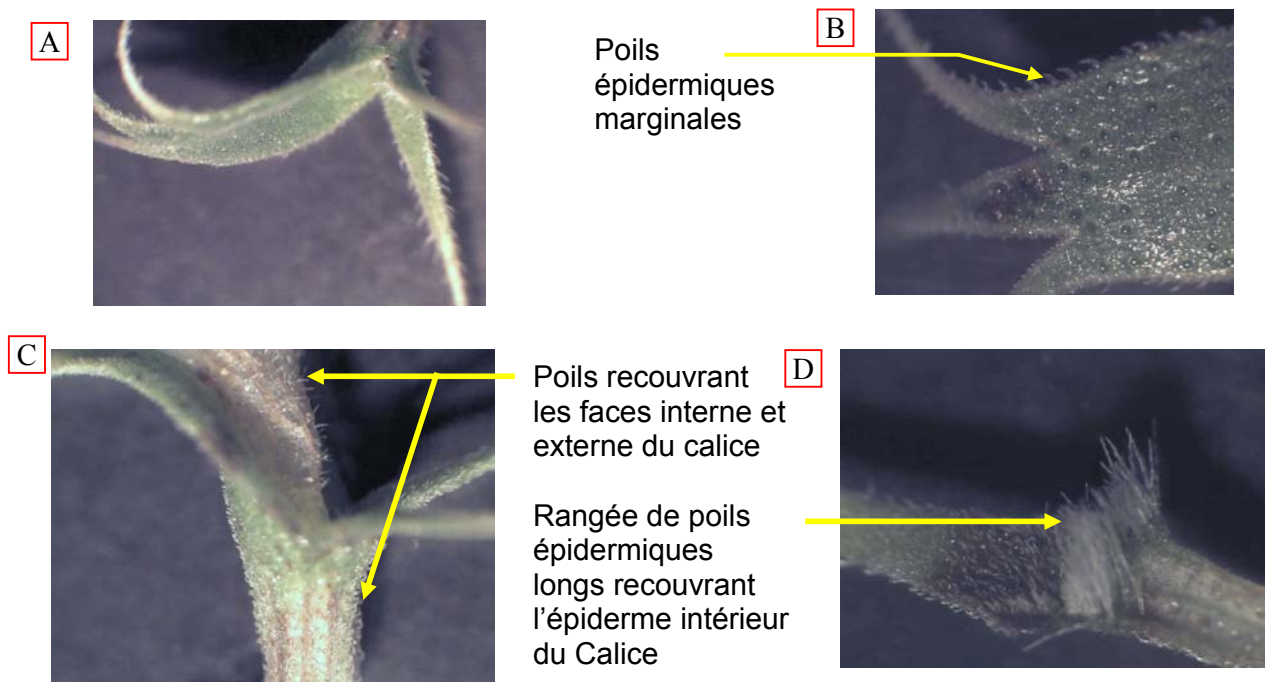


Figure 3.3 : Calice à sépales, ciliés et dentés, soudés (gamosépale) (A, B, C) avec une rangée de poils épidermiques à la base recouvrant l'épiderme intérieure (D) vue à la loupe binoculaire au grossissement G x 2.5 (Originale, 2009).

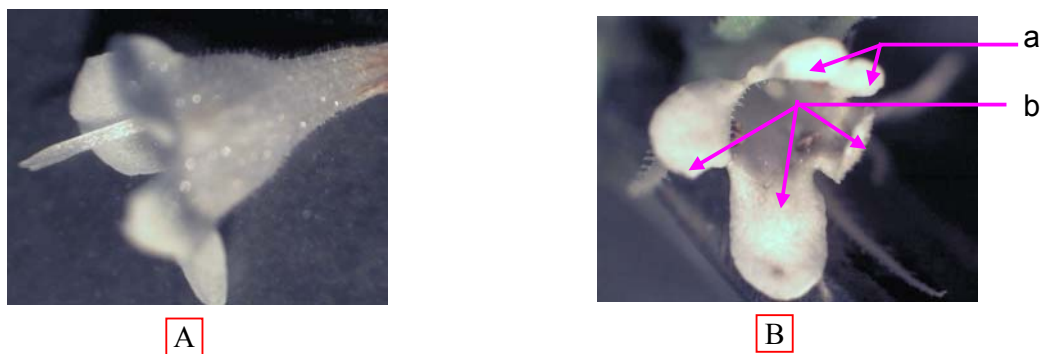


Figure 3.4 : Corolle tubuleuse (A) bilabée à 5 pétales soudés (gamopétale) : 3 pétales soudés à la base (a) et 2 totalement soudés (b) (B), vue à la loupe G x 2.5 (Originale, 2009).

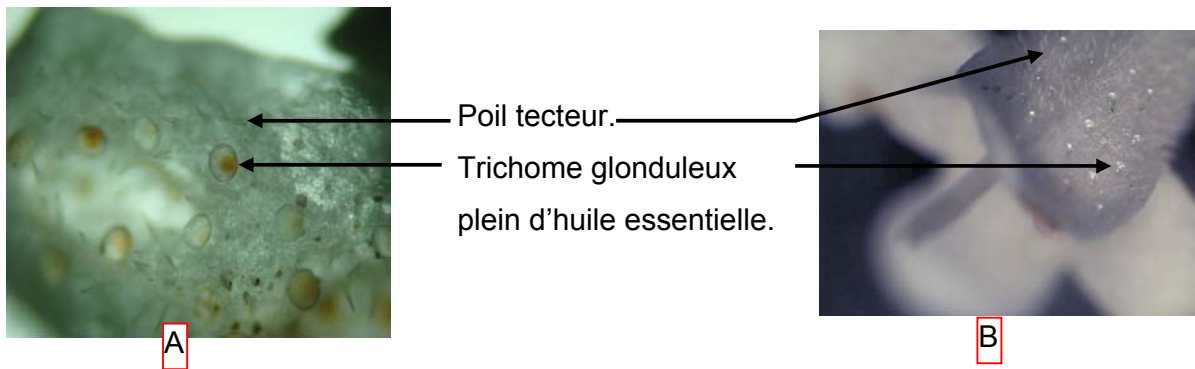


Figure 3.5 : Trichomes et poils tecteurs au niveau d'un pétale de *T. vulgaris* L. Vue au microscope G x 40 (A) et à la loupe G x 4 (Originale, 2009).

L'androcée est univerticillé formé par quatre étamines libres (androcée dialystémone) et fixés à la corolle (Figure 3.6). L'insertion du filet à l'anthère est de type médifixe (Elle se fait au milieu de l'anthère), la déhiscence des anthères pour la libération des grains de pollen se fait longitudinalement (Figures 3.7, 3.8). Le carpelle est à stigmate bifide (Figure 3.9).

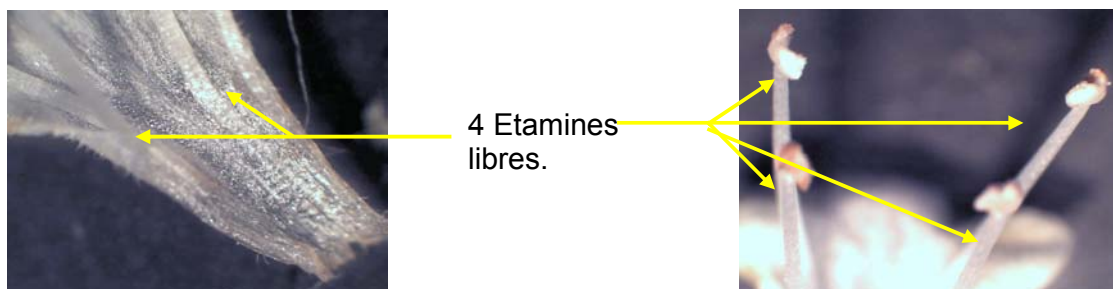


Figure 3.6: Androcé dialystémone avec étamines soudées à la corolle, vue à la loupe G x 4 (Originale, 2009).

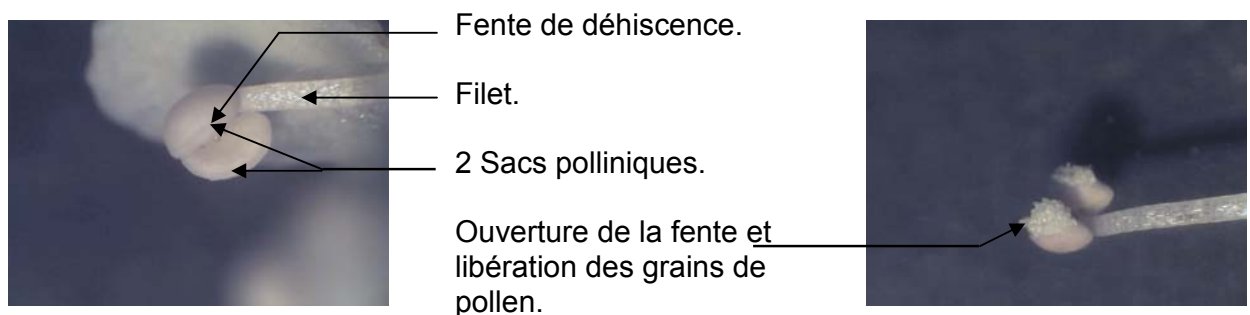


Figure 3.7: anthère médifixe à 2 sacs polliniques, vue à la loupe G x 4 (Originale, 2009).

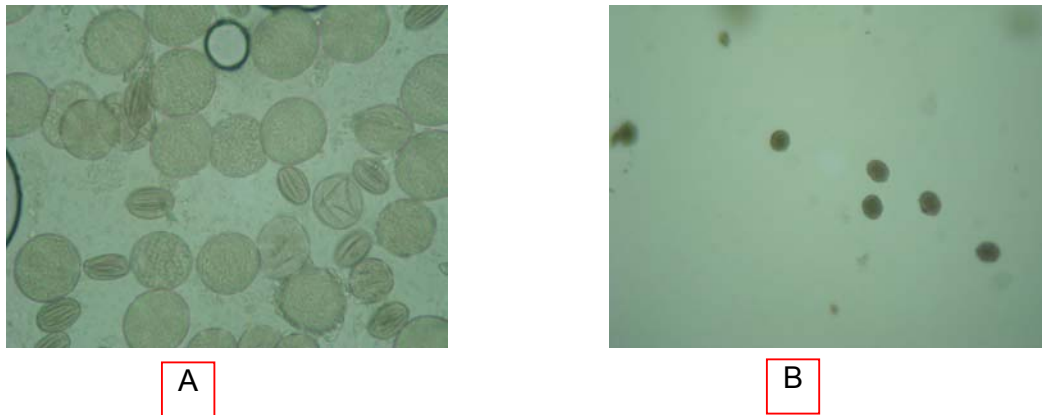


Figure 3.8: Grains de pollen vus au microscope grossissement G x 40 (A) et G x 10 (B) (Originale, 2009).

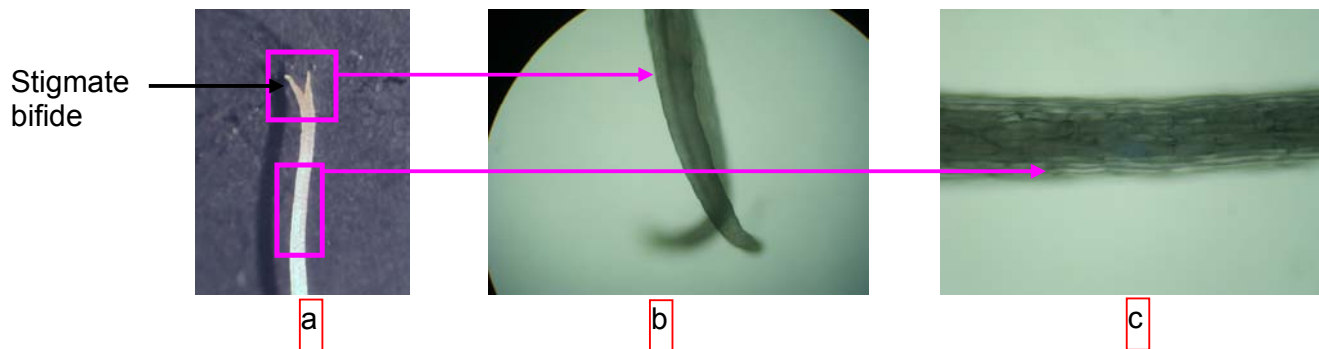


Figure 3.9 : Carpelle vue à la loupe au G x 4 (a) et au microscope photonique au grossissement G x 40 (b et c) (Originale, 2009).

3.1.2. Les fruits

A la base du calice, on note la présence d'un fruit lisse formé par quatre akènes. C'est le nuculas, ce dernier est protégé par la présence d'un voile qui l'entoure et une rangée de poils tecteurs (Figure 3.10).

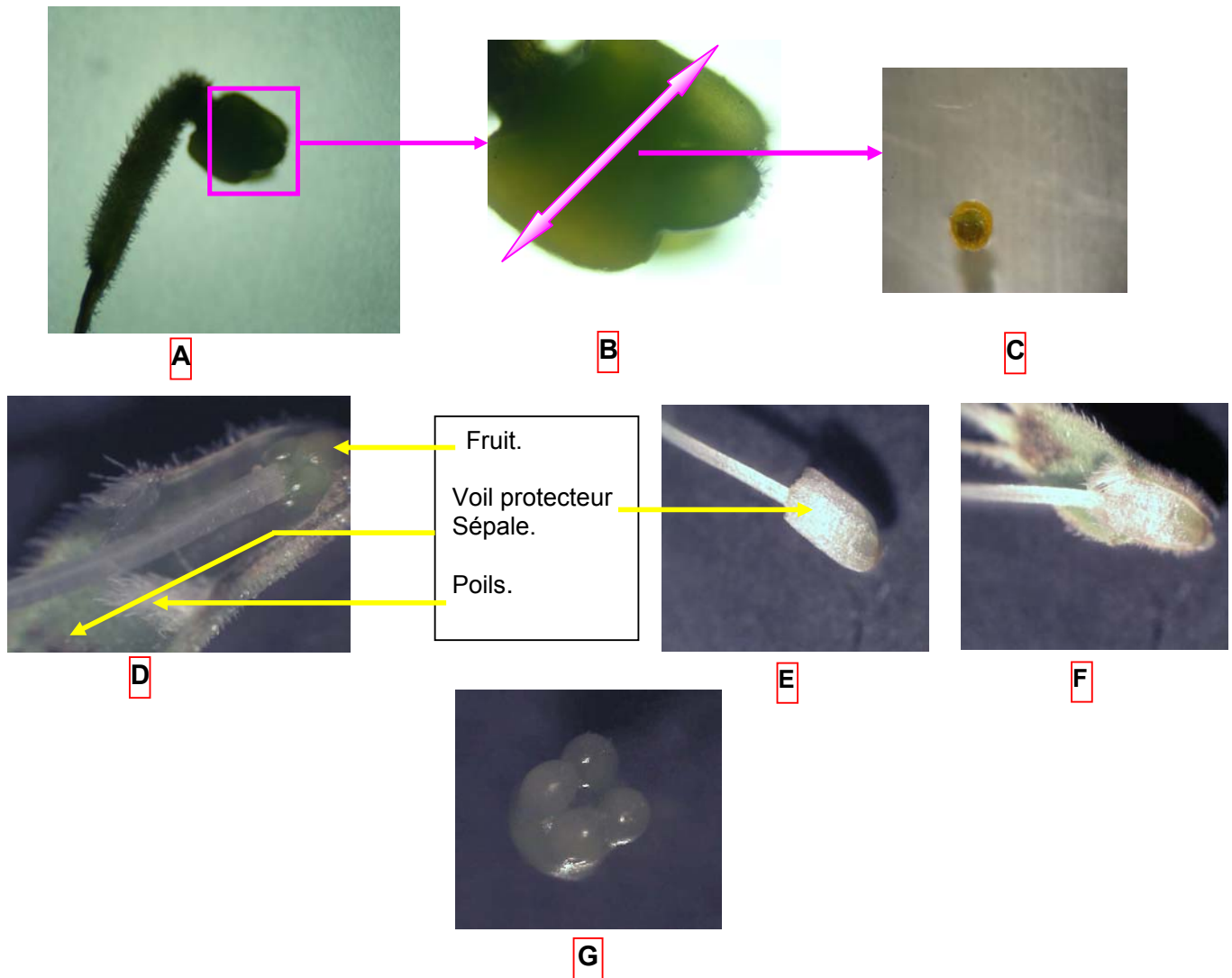


Figure 3.10: Fruit constitué de quatre akènes (Tetrakène) qui sont fixés au calice : Fruit vue au microscope Grossissement G x 10 (A) et Gx40 (B), C : Coupe transversale vue à la loupe G x 4, D : Fruit fixé à la base du calice vue à la loupe G x 4. E et F : Voile protégeant le nuculus vue à la loupe G x 4, G : Les quatre akènes formant le nuculus, vue d'en face à la loupe G x 4 (Originale, 2009).

3.1.3. La tige

La tige est totalement recouverte de poils épidermiques (Figure 3.11) ; la section de la tige est quadriforme à cause du dépôt de collenchyme au niveau des quatre angles de la tige. Les différents tissus observés sont représentés dans les figures 3.12, 3.13, 3.14, 3.15.



Figure 3.11: Tige hérissée (recouverte de poils épidermiques à disposition aléotriche) observée à la loupe binoculaire grossissement x 2.5 (Couverture holotriche) (Originale, 2009).

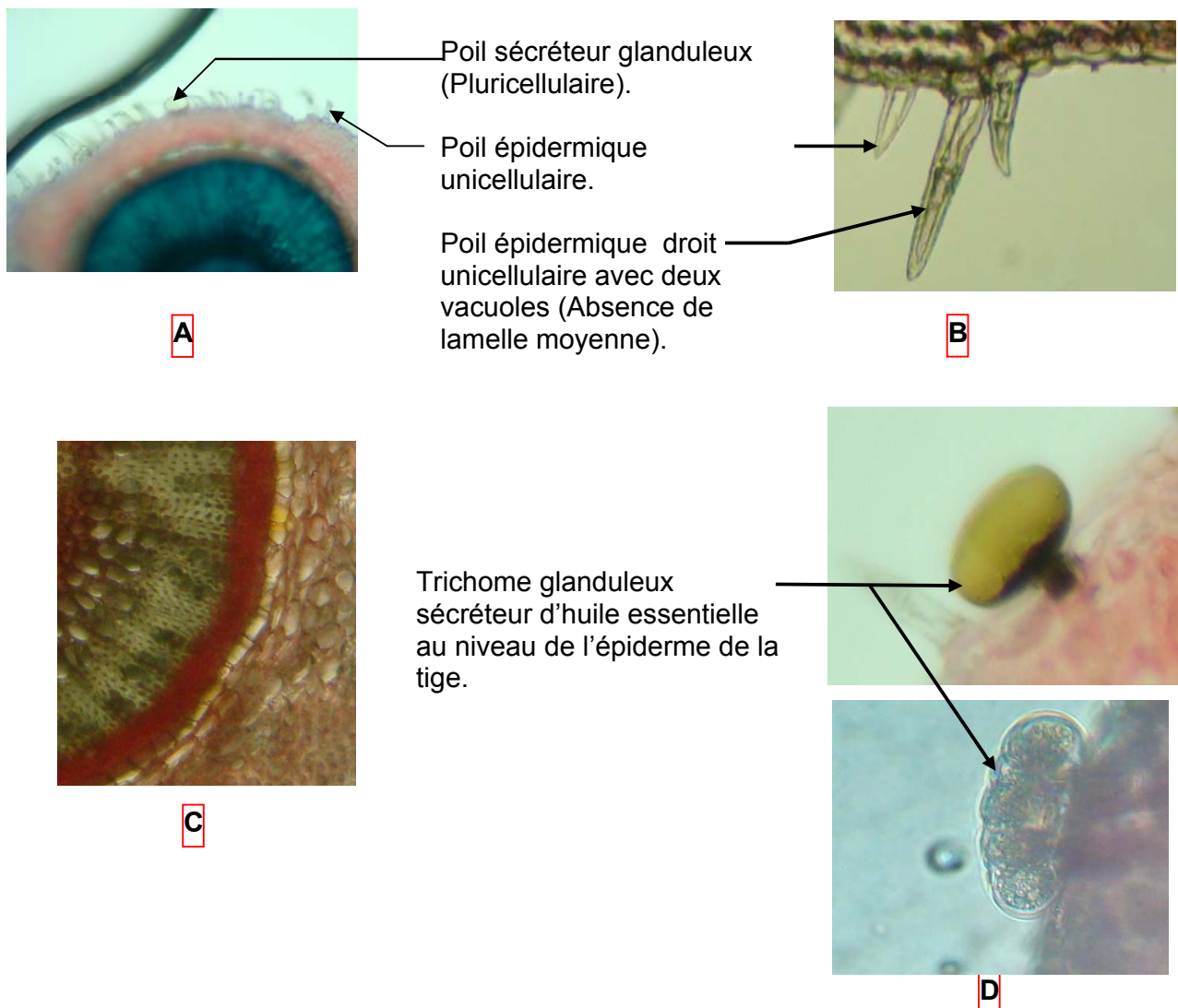


Figure 3.12: Coupe transversale au niveau de la tige (sites sécréteurs des huiles essentielles et les poils tecteurs) vue au microscope photonique G x 10 (A et C), et G x 40 (B et D) (Originale, 2009).

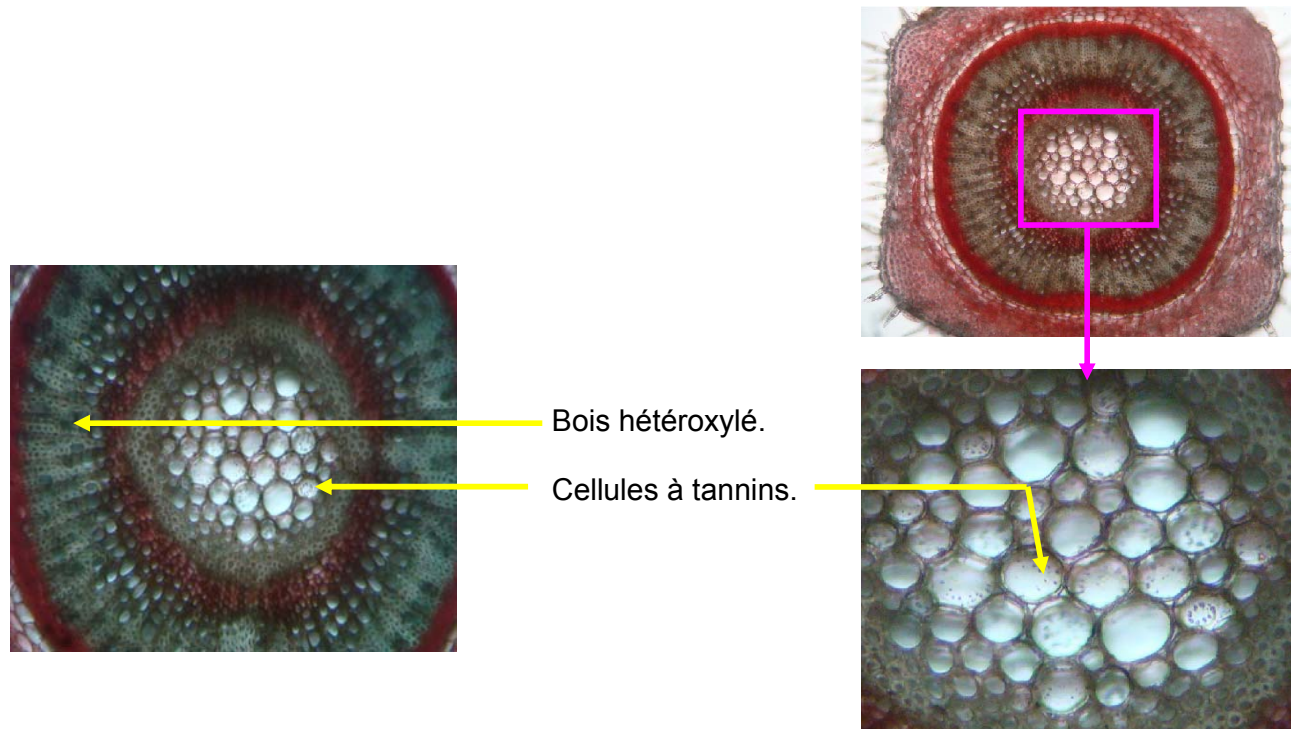


Figure 3.13 : Coupe transversale d'une tige avec cellules à tannins, bois hétéroxylé et moelle scléreuse, vue au microscope photonique G x 10 (Originale, 2009).

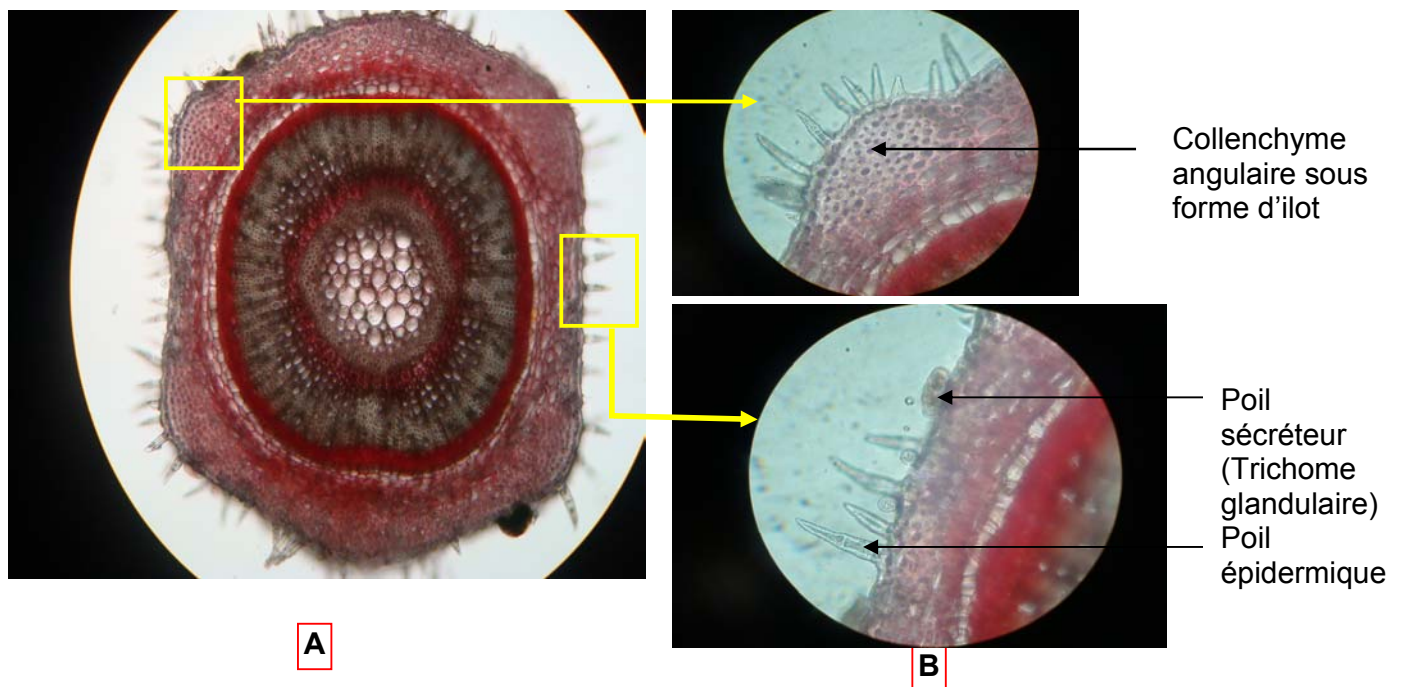


Figure 3.14 : Tige à section polygonale (Dépôt du collenchyme au niveau des angles) recouverte de poils épidermiques, vue au microscope photonique G x 10 (A) et G x 40 (B) (Originale, 2009).

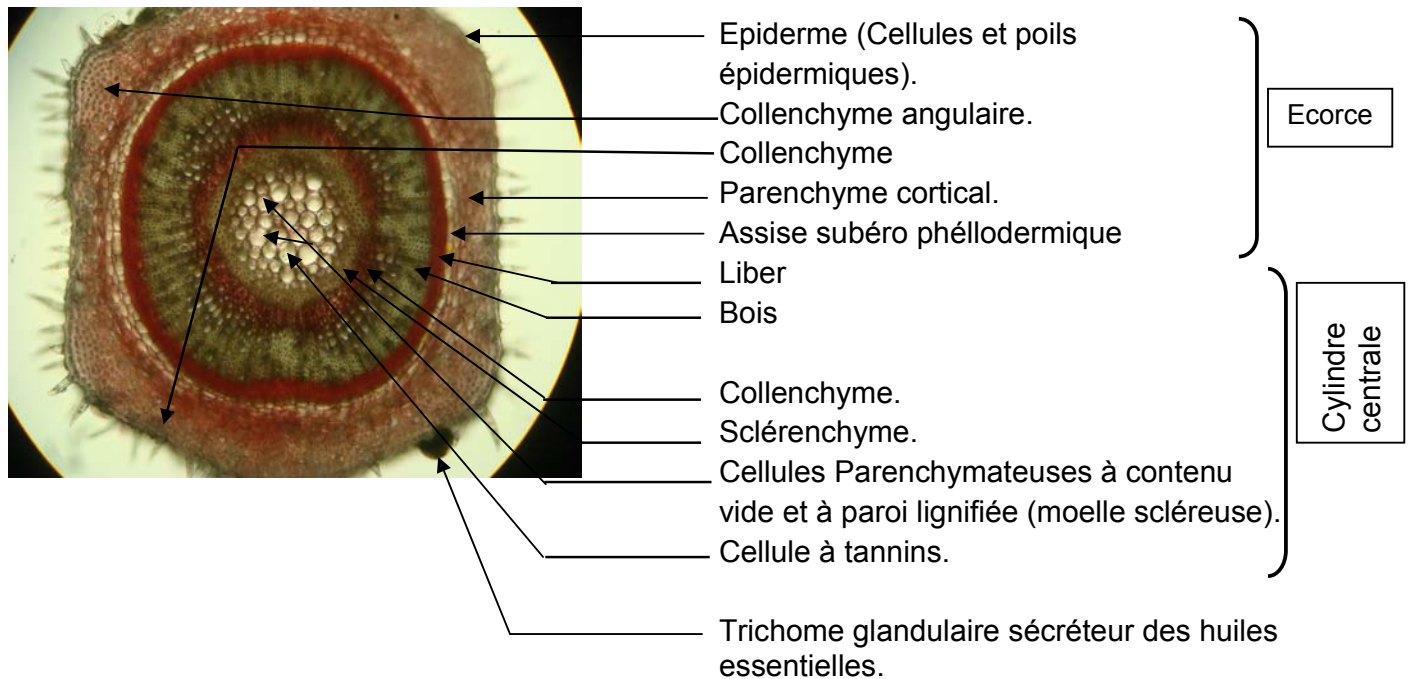


Figure 3.15 : Disposition des tissus dans la tige(de l'extérieur vers le centre), Tige de dicotylédone à structures secondaires : Tissu sécréteur d'HE (Trichomes), Tissu de recouvrement(épiderme et poils épidermiques), Tissu de soutien(Collenchyme angulaire), Tissu de remplissage (parenchyme corticale), Tissu conducteur(Phloème et xylème),Tissu de réserve (Parenchyme médullaire avec cellules à tannins), vue au microscope photonique G x 10 (Originale, 2009).

3.1.4. La feuille

Les coupes transversales et longitudinales montrent que le mésophylle est hétérogène avec parenchyme palissadique du côté supérieur de la feuille et un parenchyme lacuneux du côté inférieur (Figures 3.16). Les stomates et les douze cellules, excrétrices de l'HE, des trichomes sont représentés dans la figure 3.17 (Epiderme foliaire vue d'en face).

On note la présence au niveau de l'épiderme de la face supérieure et inférieure de la feuille de thym de poils sécréteurs glanduleux typiques au Thym. La figure 3.17 montre l'aspect microscopique de ces trichomes glanduleux (vue de face), on note des cellules glanduleuses sécrétrices d'huile essentielle disposées en rosette. L'essence produite est encore retenue sous la cuticule (Figure 3.18).

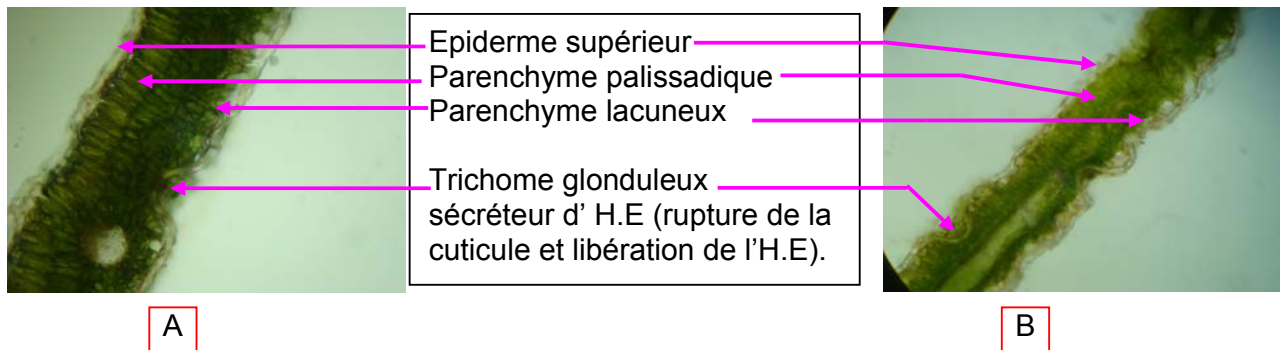


Figure 3.16: Coupes transversale (A) et longitudinale (B) au niveau de la feuille de *T. vulgaris* avec des trichomes glandulaires au niveau des deux faces supérieure et inférieure de la feuille, vue au microscope photonique G x 40 (Originale, 2009).

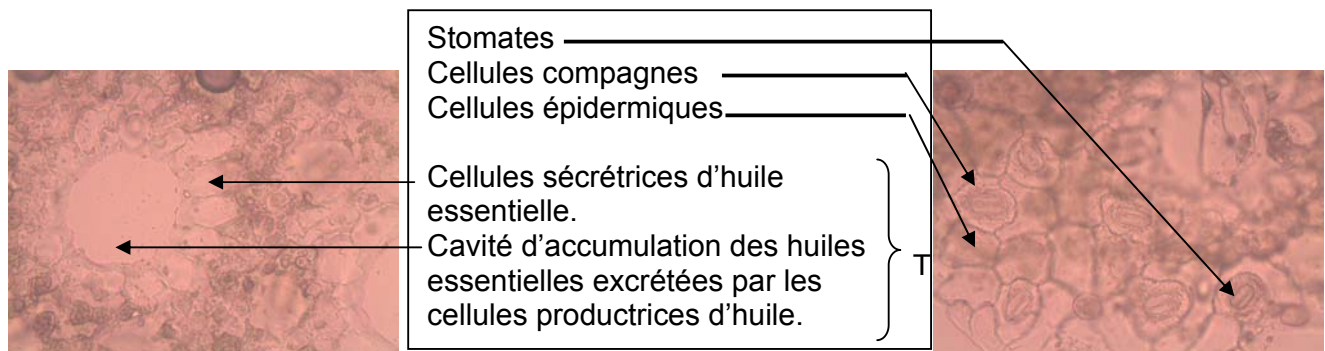


Figure 3.17: Epiderme foliaire vue d'en face au microscope au grossissement G x 40 (T : Trichome glanduleux) (Originale, 2009).

3.2. Détermination du pourcentage des minéraux

Le pourcentage des minéraux de *Thymus vulgaris* L. est évalué à 10.27 %. Selon la pharmacopée européenne 2000, le thym n'en contient pas plus de 15,0 pour cent. Donc les résultats obtenus se trouvent dans l'intervalle des valeurs déterminées par la pharmacopée.

3.3. Résultats de l'étude phytochimique

Les tests phytochimiques, nous ont permis d'obtenir les résultats suivants :

3.3.1. Caractérisation des métabolites secondaires de *Thymus vulgaris* L. (Etude qualitative)

3.3.1.1. Identification des mucilages

L'obtention d'un précipité floconneux, par mélange a indiqué la présence de mucilages.

3.3.1.2. Identification des Caroténoïdes

La coloration bleue devenant rouge par la suite a indiquée la présence de ces caroténoïdes.

3.3.1.3. Dérivés anthracéniques

3.3.1.3.1. Anthraquinones libres :

La réaction n'étant pas nettement positive, nous ne pouvons en aucun cas tirer une déduction. Il s'agirait soit d'un faux positif ou d'une teneur très faible (à l'état de traces) des anthraquinones libres.

3.3.1.3.2. Anthracéniques combinés

Ces composés n'ont pas été détectés dans l'extrait de feuilles de *T.vulgaris* L.

3.3.1.4. Identification des Tanins

D'après la coloration obtenue avec le FeCl_3 , Les feuilles contiendraient des tanins catéchiques.

En effet, l'apparition d'un précipité rouge en présence de l'alcool chlorhydrique confirme le résultat obtenu par le test au FeCl_3 .

3.3.1.5. Identification des Alcaloïdes

Le réactif de Dragendorff a donné un précipité rouge orangé indiquant la présence des alcaloïdes.

Les résultats des tests du screening chimique sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 3.1: Métabolites secondaires détectés dans les feuilles de *Thymus vulgaris* L. :

Nature des composés chimiques		Type de réaction	Résultat	Réaction
Mucilages		Réaction à l'éthanol absolu.	+++	positive
Caroténoïdes		Réaction au trichlorure d'antimoine	+++	positive
Dérivés anthracéniques	Anthraquinones libres	Réaction de borntrager	±	Difficile à interpréter
	Dérivés anthracéniques combinés : Les O-hétérosides	Réaction au chloroforme et à NH_4OH	-	Négatif (Composé non détecté)
Tanins	Tanins catéchiques	Réaction avec du FeCl_3	+++	positive
	Tanins galliques		-	Négatif (Composé non détecté)
Alcaloïdes		Test de Dragendorff	++	positive

3.3.2. Evaluation de la teneur en certains composés chimiques de *Thymus vulgaris* L.(Etude quantitative)

3.3.2.1. Dosage des composés non volatils

3.3.2.1.1. Dosage spectral des composés phénoliques

3.3.2.1.1.1. Dosage des composés phénoliques totaux

La teneur en composés phénoliques totaux est déterminée par une méthode colorimétrique utilisant le réactif Folin-Ciocalteu [165; 120].

Une courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide d'un standard, l'acide gallique, et est représentée dans la figure 3.18. Les teneurs sont exprimées en mg d'acide gallique /ml.

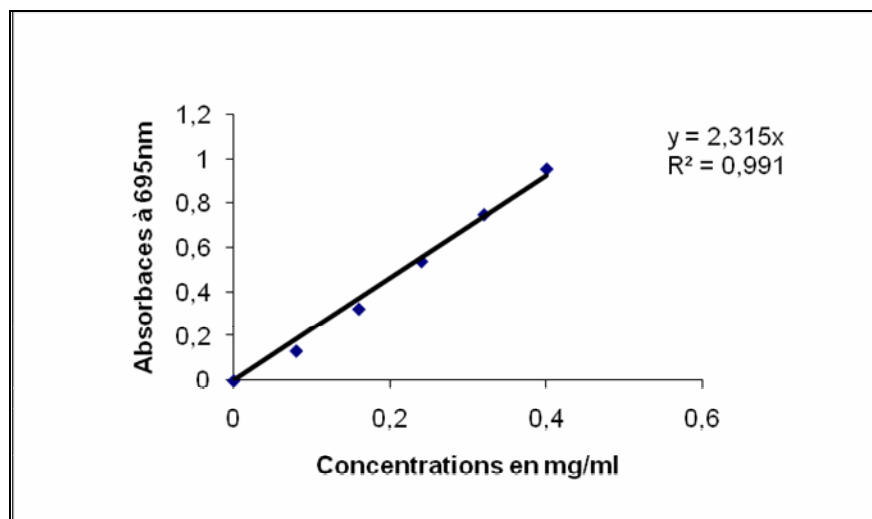


Figure 3.18 : Courbe étalon des composés phénoliques totaux

L'absorbance de l'échantillon dilué au 2/50 ème à la longueur d'onde $\lambda = 695$ nm est de 0.2809. La concentration correspondant à cette valeur a été calculée à partir de l'équation de la droite du standard.

On constate que 1 g de feuilles sèches de thym renferme environ 22.01 ± 0.12 mg de composés phénoliques totaux. On a obtenu des résultats très voisins en suivant le protocole de dosage des composés phénoliques totaux adopté par MARCULESCU et al. (2007).

La teneur en composés phénoliques totaux, du Thym est supérieur à celle trouvée par WOJDYLOA et al. (2007) pour *Thymus vulgaris* L. de la Pologne qui

est égale à 5.8 mg/g et à celle retrouvée pour *T. caramanicus* (12.43mg/g) [220] et pour *T. spathulifolius L.* (14.1mg/g) [234] et pour *T. Serpyllum L.* (11.3 mg/g) [165]. Cependant, la valeur trouvée est inférieure à celle obtenue par ISMAILIA et *al.* (2004) pour *T. satureioides L.* (35.5 mg/g) et à celle de TAWAHA et *al.* (2007) pour le romarin qui est de 48.9 mg/g. Ces derniers ont utilisés une méthode différente de la notre.

Le Thym parait contenir une quantité assez élevée de composés phénoliques comparé à d'autre plantes tel que *Origanum vulgare L.* (1.5 mg/g) [268], *Teucrium polium L.* (4.92 mg/g) [81], *Mellissa officinalis L.* (13.2 mg/g) [29], mais cette teneur en composés phénoliques reste inférieur à celle de *Salvia sclarea L.* (24.0 mg/g) [174].

La méthode au réactif de Folin- Ciocalteu donne une estimation brute des composés phénoliques présents dans l'extrait [270; 247]. Ces derniers subissent une réaction d'oxydo-réduction complexe avec les acides phosphotungstiques et phosphomolybdiques présents dans le réactif [270].

3.3.2.1.1.2. Analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) des composés phénoliques

Selon cette deuxième méthode d'évaluation de la teneur en composés phénoliques de la plante, on constate que 1 g de feuilles séchées et pulvérisées de *Thymus vulgaris L.* contient 21.42 mg de composés phénoliques totaux.

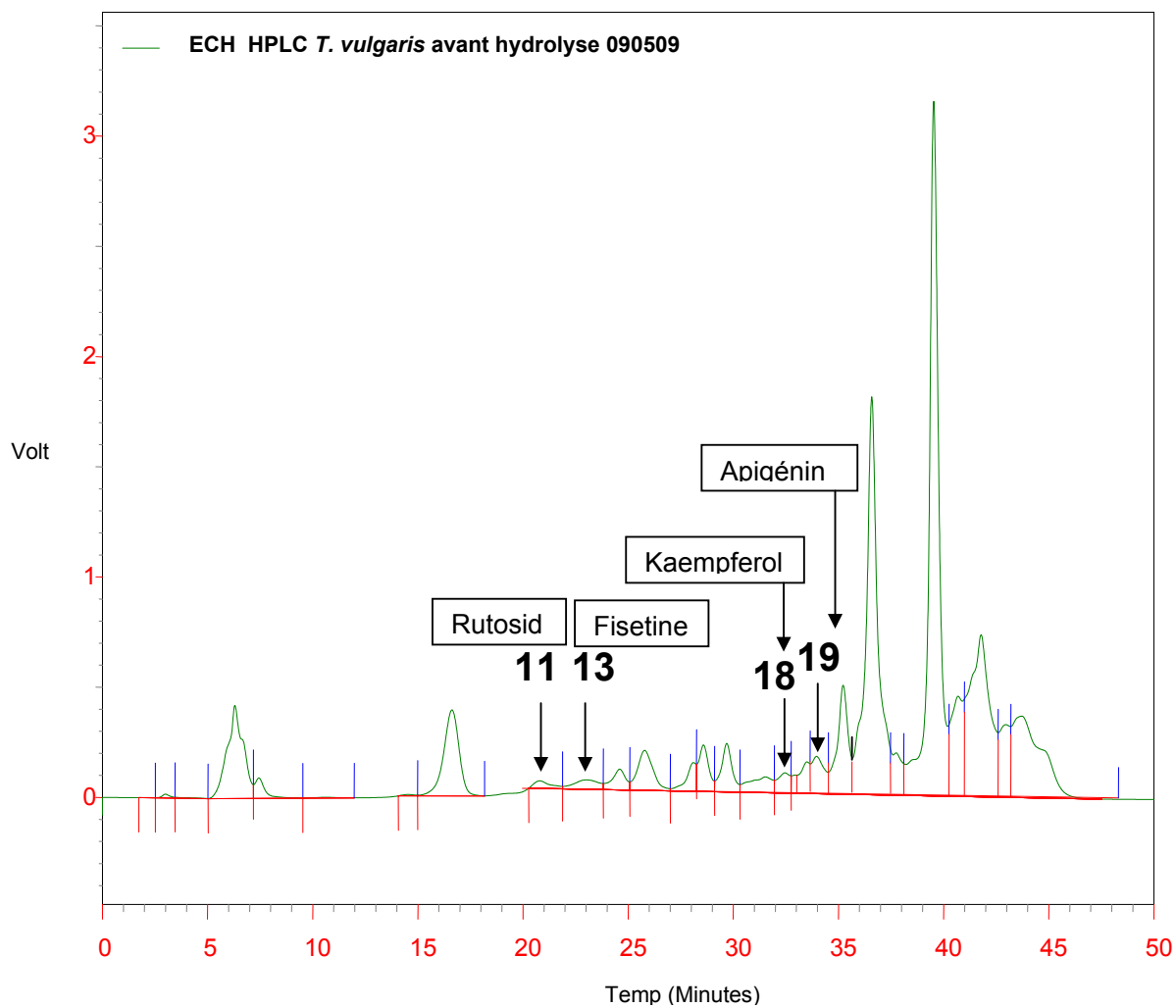


Figure 3.19 : Chromatogramme de l'HPLC de *T.vulgaris* L. avant hydrolyse.

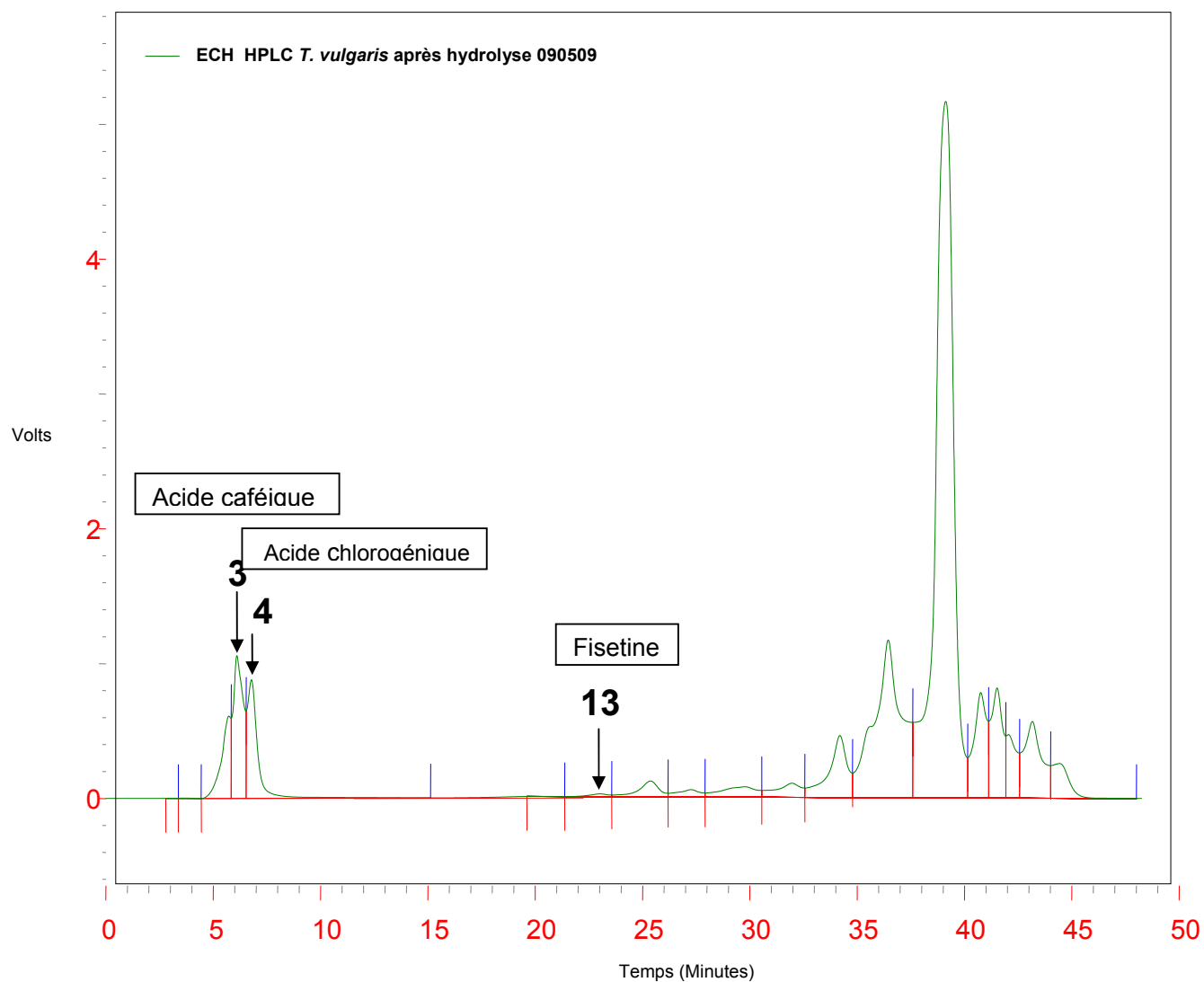


Figure 3.20 : Chromatogramme de l'HPLC de *T.vulgaris* L. après hydrolyse.

Tableau 3.2 : Concentration des composés phénoliques détectés avant et après hydrolyse acide exprimées en mg/ 100g de matière végétale sèche.

N°	Composé phénolique	Temps de rétention (R _t)	Pourcentage (%)	Concentration (mg /g)
3	Acide caféique	6.10	5.04	1.10
4	Acide chlorogénique	6.80	4.47	0.983
11	Rutoside	20.78	0.45	0.10
13	Fisetine	23.1	0.83	0.182
18	Kaempferol	32.5	0.89	0.195
19	Apigénine	33.95	1.65	0.363

La teneur en acide caféique qui est un acide phénolique (110 mg/100g) est inférieure à celle trouvée par WOJDYLOA et *al.* (2007) pour *Thymus vulgaris L.* de la Pologne qui est de 517 mg/ 100 g, et à celle trouvée par REGNAULT-ROGER et *al.* (2004) pour *Thymus vulgaris L.* de France qui est de 289 mg/100g. Tandis que cette valeur est supérieure à celle retrouvée par REGNAULT-ROGER et *al.* (2004) pour *Thymus serpyllum L.* de France qui est de 71 mg/ 100 g.

On constate aussi que notre plante contient de l'apigénine qui est un flavonol [223] à raison de 36.3 mg/ 100 g, alors que le *Thymus vulgaris L.* du Danemark en contient 5 mg/100 g. Ce dernier Thymus contient également du Luteolin à raison de 51 mg/100g, composé ne faisant pas partie de la composition de notre plante [138].

3.3.2.1.2. Résultats des dosages spectraux d'autres métabolites secondaires

3.3.2.1.2.1. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux de *Thymus vulgaris* qui est de 4.356 ± 0.055 mg / g est plus faible que celles retrouvées par REGNAULT-ROGER et *al.* (2004) pour deux espèces de Thymus de France qui sont de 10.54 mg/g pour *T. vulgaris L.* et 7.3 mg/ g pour *T. serpyllum*. Cependant, cette valeur est supérieure à celle de *Thymus pulegioides L.* de la Lituanie qui est de 2.5 mg/g, trouvée par LOZIENE et *al.* (2007).

La teneur en polyphénols et flavonoïdes varie selon les familles de plantes [81; 141] et la partie de la plante utilisée [44; 268].

En comparant la valeur trouvée avec les résultats obtenus par DJERIDANE et *al.* (2006) pour des plantes algériennes, on constate que le Thym contient une quantité supérieure en flavonoïdes comparée à celle obtenue pour *Ruta Montana* (la rue) (1.62 mg/g), *Artemisia arborescens* (Armoise arborescente) (3.25 mg/g) et *Juniperus oxycedrus* (Genévrier oxycèdre) (3.5 mg/g); cependant, cette valeur reste inférieure à celle obtenue par les mêmes auteurs pour *Artemisia campestris* (Armoise champêtre) (7.46 mg/g) et *Artemisia herba halba* (Armoise blanche) (11.31 mg/g).

3.3.2.1.2.2. Dosage des chlorophylles

Les teneurs en chlorophylles de notre plante sont de 1.5596 ± 0.05 mg/ g pour la chlorophylle a et de 1.124 ± 0.08 mg/g pour la chlorophylle b. Ainsi la teneur en chlorophylle totale est de 2.67 ± 0.085 mg/g de matière végétale sèche.

Selon ces résultats, on constate que notre plante contient un peu plus de chlorophylle que *Lavendula latifolia* de l'Espagne qui est de 2.01 mg/g, valeur retrouvée par MUNOZ-BERTOMEU (2006).

Une étude menée au Venezuela ; sur la teneur en chlorophylle de 10 espèces de labiées, a donné des résultats variant de 0.37mg/g à 0.66mg/g pour la chlorophylle a et 0.21mg/g à 0.35mg/g pour la chlorophylle b [50].

Les chlorophylles sont une importante classe de composés biologiques, largement distribués dans les plantes vertes.

A cause de la présence d'une longue chaîne carbonée, à doubles liaisons conjuguées, les chlorophylles sont sensibles à la lumière, la chaleur, l'oxygène et la dégradation acide [57].

Chimiquement le changement de couleur est dû à la conversion de la chlorophylle a et b en phéophytine a et b. Les ions hydrogènes peuvent transformer les chlorophylles en phéophytines en remplaçant l'atome de Mg dans le noyau porphyrine [159].

3.3.2.1.2.3. Dosage des caroténoïdes

La figure 3.21 représente la courbe d'étalonnage des caroténoïdes réalisée à l'aide d'un standard le β -carotène. Les concentrations sont exprimées en mg de β -carotène/ml.

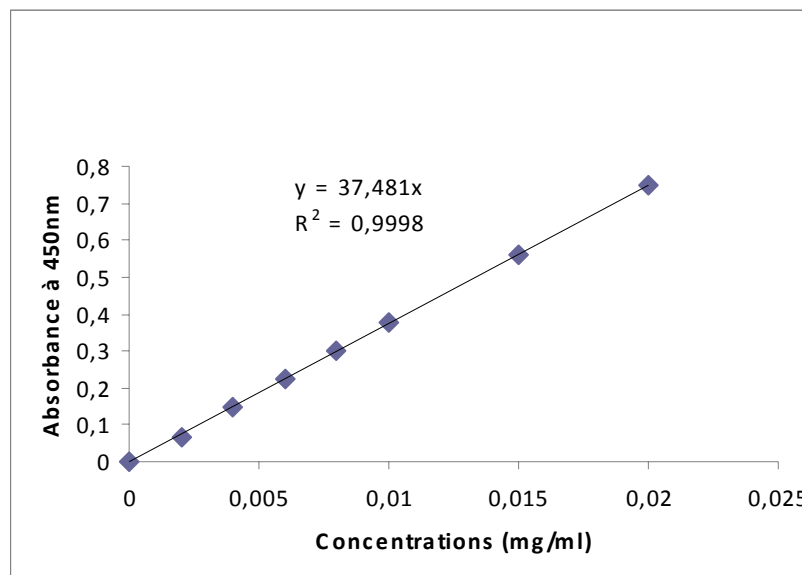


Figure 3.21 : Courbe étalon des caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes de notre plante est de 38.24 mg/100g de poids sec. Ces résultats sont supérieurs à ceux retrouvés par CAPECKA et *al.* 2005 en ce qui concerne *Mentha piperita* L. (32.7 mg/ 100 g), *Melissa officinalis* L. (21.0 mg/ 100 g) et *Origanum vulgare* L. (25.5 mg/ 100 g) . Les différences de teneurs en caroténoïdes peuvent être liées aux conditions climatiques et géographiques et à l'espèce végétale [205].

Les caroténoïdes permettent la protection contre les dommages oxydatifs, augmentent le taux de métabolites détoxificateurs (glutathion réduit, métallothionéine, enzymes telles que la superoxyde dismutase, glutathion peroxydase), restaurent la fonction suppressive des tumeurs par le système immunitaire et inhibent l'expression excessive des oncogènes qui favorisent le cancer [114].

L'efficacité antioxydante des caroténoïdes est mise en évidence par la stabilité de la structure formée entre le radical et le pigment. Ce qui montre que ces pigments ont un effet scavenger sur les radicaux libres tel que le DPPH (Diphenyl picryl hydrazine) [114].

Les caroténoïdes sont sensibles à l'oxydation et aux radiations, et peuvent être détruites durant le processus de séchage [47]. Ils semblent avoir une susceptibilité différente vis-à-vis de l'oxydation ; le β -carotène, luteine, et le violaxanthine étant les plus labiles. La formation des époxydes et apocarotenoides

(carotenoides à courtes chaînes) semble être l'étape initiale. Des fragmentations successives produisent des composés à faibles poids moléculaires, similaires à ceux produits lors de la dégradation des lipides. Ainsi, la perte totale des couleurs et des activités biologiques en sont la conséquence finale [217].

3.3 .2.2. Dosage de la fraction volatile (H.E)

3.3.2.2.1. Influence des paramètres d'extraction sur le rendement en huiles essentielles (Etude cinétique)

3.3.2.2.1.1. Influence de la température d'extraction

Selon la figure 3.22, on constate que à température comprise entre les valeurs de 130 °C et 150 °C, les rendements sont très faibles. Ces derniers s'améliorent en élevant la température jusqu'à un maximum où on obtient un plateau.

Cependant on remarque que la qualité organoleptique de l'huile essentielle change, les indicateurs de ce changement sont la variation de couleur en brun très foncé de l'huile et son odeur qui devient très accentuée ne relevant pas de l'odeur caractéristique du thym, mais plutôt, une perte partielle de cette odeur. Ceci pourrait être expliqué par l'oxydation et la rupture de liaisons des composés complexes de l'huile, causée par l'élévation importante de température.

On note également que le rendement en HE a légèrement baissé au delà de la valeur de température de 175 °C, ceci est dû aux pertes de vapeurs d'eau et d'huiles sortant de la partie « N » de l'hydrodistillateur (Figure 2.18) au cours de l'opération d'extraction. Cela nous mène à adopter la température de 175 °C comme une température optimale d'extraction.

Les mêmes résultats ont été obtenus par ROUATBI et *al.* (2007), ces auteurs ont réalisés une étude de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle du Thym et ont trouvés que la meilleure température d'extraction, pour laquelle on obtient un meilleur rendement et une bonne qualité de l'huile essentielle de thym, est de 175 °C [218].

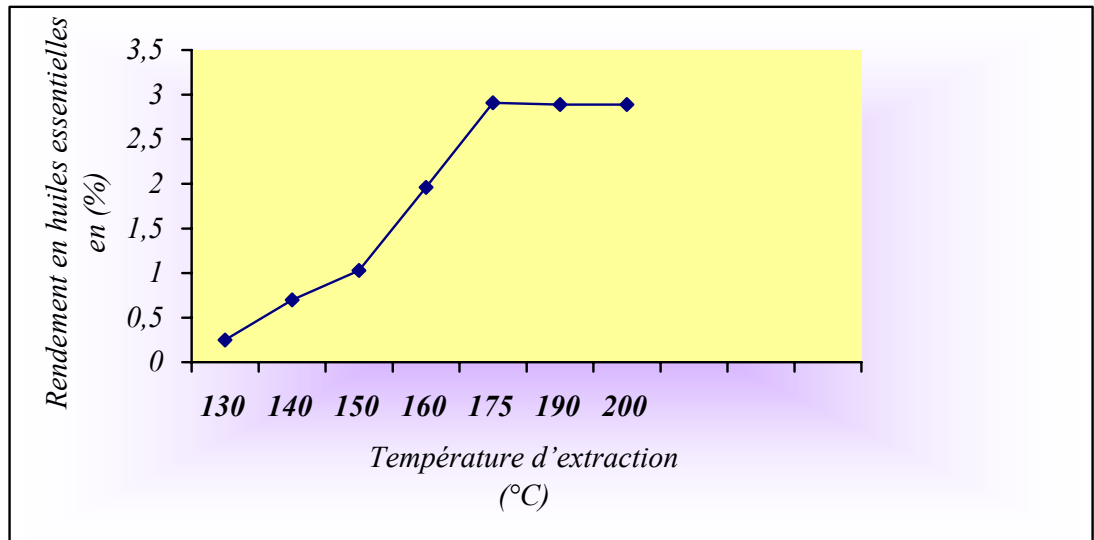


Figure 3.22 : Evolution du rendement en huiles essentielles en fonction de la température d'extraction par hydrodistillation de *Thymus vulgaris L.*

3.3.2.2.1.2. Influence de la masse végétale

Les résultats obtenus montrent que le rendement en huiles essentielles augmente respectivement pour les masses de 5, 10, 15, 20 g, et atteint une valeur maximale pour la masse de la matière végétale sèche de 25 g. Ce rendement diminue pour la masse de 30g. Cela est dû à la quantité de la matière végétale qui est plus importante que le volume d'eau (Le mélange matière végétale- eau est très dense ne permettant pas un contact homogène, donc l'accessibilité de l'eau aux sites de stockage de l'huile essentielle), par conséquent, le volume d'eau ne peut pas entraîner la totalité des H. E (Figure 3.23).

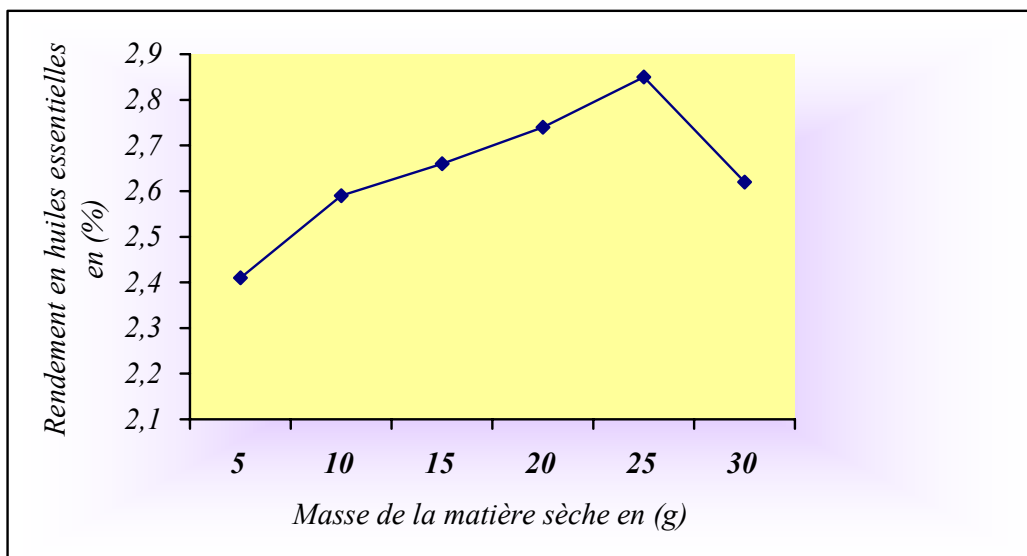


Figure 3.23 : Evolution du rendement en huiles essentielles en fonction de la masse de la matière végétale au cours de l'hydrodistillation de *Thymus vulgaris L.*

3.3.2.2.1.3. Influence de l'hydromodule

Le meilleur rendement est obtenu avec le rapport 1/10 (Figure 3.24). Il correspond à la meilleure répartition de la matière végétale par rapport au volume d'eau. Pour les rapports 1/4, 1/5, 1/6 et 1/8, il y a peu d'eau par rapport à la quantité de matière végétale. Il en résulte qu'une partie de la matière végétale n'est pas mouillée et l'eau s'évapore rapidement et fini par s'épuiser sans donner le temps aux huiles essentielles d'être extraites.

Un faible rendement a été obtenu pour le rapport 1/12. Dans ce cas, l'eau étant en grande quantité, même après évaporation on remarque, qu'il en reste une certaine quantité contenant l'huile essentielle libérée des trichomes sécréteurs des feuilles n'ayant pas eu le temps nécessaire pour être distillée totalement.

Les résultats que nous avons obtenus concordent avec ceux obtenus par BENDRISS (2003), qui a constaté que l'augmentation de l'hydromodule influence directement le rendement en huiles essentielles extraites de *Ruta chalepensis* et *Marrubium vulgare*.

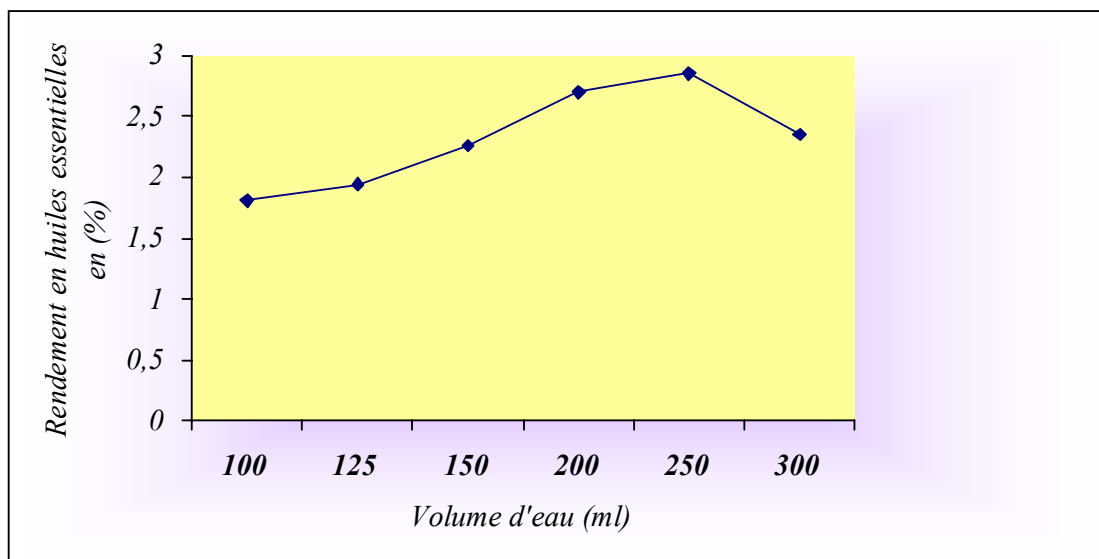


Figure 3.24 : Evolution du rendement en huiles essentielles en fonction de l'hydromodule utilisé pour l'hydrodistillation de *Thymus vulgaris L.*

3.3.2.2.1.4. Influence de la durée d'extraction

Le rendement en huile essentielle augmente de façon proportionnelle à la durée d'extraction jusqu'à un maximum après 90 min d'hydrodistillation ensuite ce rendement ralentit remarquablement où il se stabilise plus au moins après deux heures d'extraction (Figure 3.25).

On remarque que 77,19 % du total du rendement en HE a été obtenue à la 45^{ème} minute d'hydrodistillation, la totalité ayant été obtenue au bout de 150 min.

Les travaux ayant portés sur l'étude de la cinétique et le rendement d'extraction des huiles essentielles de thym obtenues par hydrodistillation, ont montré que 70% du rendement global de l'huile essentielle par hydrodistillation est obtenu après 18 minutes, et que la totalité de l'huile est obtenue au bout de 120 minutes [121].

La courbe montre deux phases :

Une phase rapide correspondant à une augmentation nette du rendement, ceci est probablement dû à la localisation superficielle des structures de la plante qui synthétisent les essences.

Une phase lente qui correspond à la libération du contenu des cellules internes pouvant stocker l'huile essentielle. Ces cellules étant en faible nombre, cela explique le ralentissement de l'augmentation du rendement.

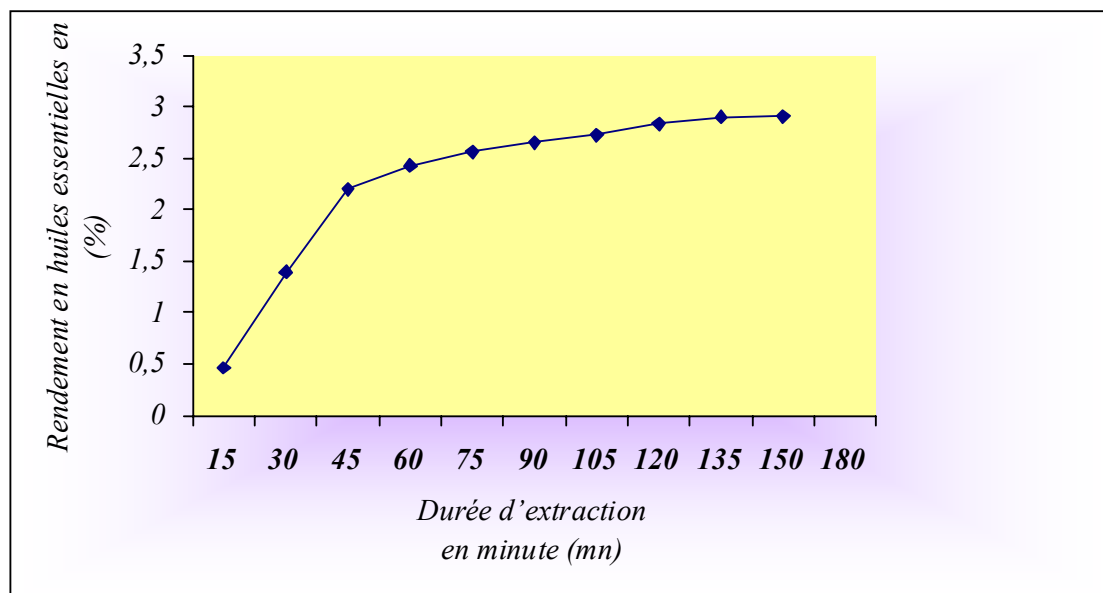


Figure 3.25 : Evolution du rendement en huiles essentielles en fonction du temps d'extraction par hydrodistillation de *Thymus vulgaris* L.

3.3.2.2.1.5. Influence de la période de récolte

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 3.7 et la figure 3.26. On note que le rendement en huile essentielle varie en fonction du stade végétatif de la plante. Le meilleur rendement est obtenu lorsque la plante est cueillie pendant la période d'inflorescence qui correspond au début du mois de Mai (2.34 %). Ce rendement s'améliore (2.91 %) si la matière végétale est séchée avant d'être traitée.

Ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus par JORDAN et *al.* (2003) qui n'ont pas trouvé de différence significative concernant le rendement en huile essentielle de *Thymus hyemalis* L. récolté pendant différentes saisons.

Selon ces auteurs, l'approvisionnement en eau et la saison de récolte de la matière végétale n'influencent pas le rendement en HE. La différence entre nos résultats et ceux de JORDAN et *al.* (2003) sont les conditions climatiques de notre pays différentes de celle de l'Europe (Saison d'été très chaude ce qui stimule la forte production d'huiles essentielles par les plantes en vue de se protéger, et celle d'hiver froide donc la production diminue).

L'analyse par la CPG/ SM de la composition des HE extraites, correspondant aux différentes saisons, a montré une différence importante du point de vue qualitatif (nature des composantes) et quantitatif (pourcentage par rapport au total des constituants de l'huile) [135].

L'hydrodistillation de la matière sèche et de la matière fraîche du végétal a montré qu'à l'état sèche les rendements sont meilleurs. Ces résultats ont été confirmés par ceux obtenus par SOCACIET *al.* (2008), car la quantité d'HE extraite par hydrodistillation de 40g de feuilles sèche de Romarin était de 2.52 ml par contre celle obtenu à partir de la même masse de feuilles fraîches était de 1.69 ml [233]

L'analyse chimique par la CPG/SM des HE obtenues à partir des feuilles fraîches du Romarin réalisée par SOCACI et *al.* (2008), a montrée un nombre très élevé de composants volatils par rapport à ceux obtenus à partir des feuilles sèches (Tableau 3.8 et figure 3.31).

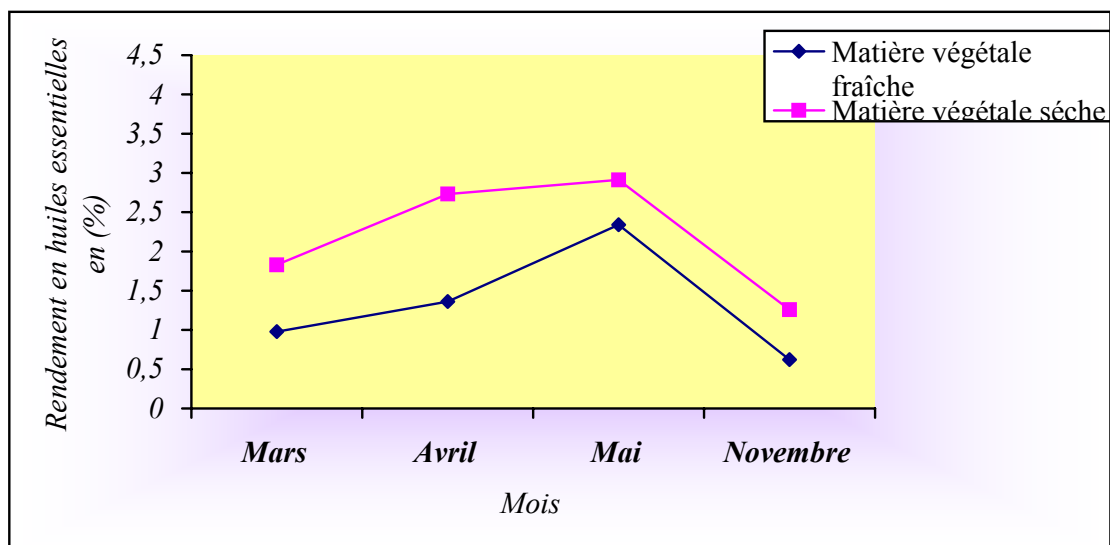


Figure 3.26 : Evolution du rendement en huiles essentielles en fonction de la période de récolte de *Thymus vulgaris L.*

Les résultats obtenus concernant les conditions optimales d'extraction de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris L.* montrent que la période durant laquelle la plante doit être cueillie est le mois de Mai, la matière végétale doit être séchée

avant de procéder à l'hydrodistillation, et cette dernière devrait se faire à 175 °C pendant une durée de 2 h et 30 min. Pour un ballon à capacité de 500 ml, la masse de la matière végétale ne doit pas dépasser 25 g dans une quantité d'eau présentant 10 fois cette valeur (250 ml).

3.3.2.2. Caractérisation physico-chimique et organoleptique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L.

Les résultats sont rapportés dans le tableau ci-dessous:

Tableau 3.3 : Caractérisation organoleptique et physico-chimique des extraits bruts

Caractéristiques	Norme (AFNOR,1985)	Résultats trouvés
Aspect	Liquide mobile et limpide	Liquide
Couleur	Jaune à brun-rouge	Brun rougeâtre
Odeur	Epicée rappelant celle du thymol	agréable, épicée rappelant celle du thymol
Densité à 20°C (g /Cm ³)	0,900 - 0,935	0,9288
Indice d'acidité (Ia)	/	2,68
Indice de saponification (Is)	/	0.3141
Indice de réfraction (I _R)	1,462 - 1,505	1,502
Pouvoir rotatoire (P _R)	-6° à 0°	+ 0.00797
PH	/	5.3

L'examen de ces résultats montre que les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. sont conformes aux normes A.F.N.O.R et ceux déterminées par la Pharmacopée européenne 2005.

3.3.2.2.3. La composition chimique de l'Huile essentielle de *Thymus vulgaris L.*

L'analyse des résultats obtenus (tableaux 3.4, 3.5, 3.6 et figures 3.27, 3.28 et 3.29) a montré que les trois fractions d'échantillons d'huiles essentielles obtenues dans différentes conditions opératoires, ont des compositions différentes et des teneurs différentes s'il s'agit d'un même composé.

En effet, on remarque que l'huile obtenue après une demi-heure d'extraction (Tableau 3.4) contient moins de composés volatils (14 composés) que celle obtenue après trois heures d'extraction (20 composés). Cependant, la plupart des composés sont extraits à la première demi heure de l'extraction. Les fractions d'huiles extraites en dernier contiennent : Le camphène, β -pinène, dihydrocarvone-cis, dihydrocarvone-trans, caryophyllène et l' humulène.

L'étude de l'évolution de l'extraction des composantes majeures de l'HE du Thym en fonction du temps par hydrodistillation, réalisée par HEDHILI et *al.* (2007), a montrée que les précurseurs biosynthétiques du Carvacrol: le p-cymène et le γ - terpinène sont les premiers composés extraits. Le carvacrol, composé majoritaire de l'huile n'apparaît qu'après les huit premières minutes. L' α -terpinène et le α -phéllandrène (ce dernier composé ne fait pas partie de la composition de notre huile essentielle) sont présents dans la deuxième fraction de l'huile essentielle (8-18 mn) [121]. Ces résultats sont similaires à ceux que nous avons trouvés.

Tableau 3.4 : Composition chimique de l'huile essentielle de *T.vulgaris L.* récoltée durant le mois de mai et extraite par hydrodistillation pendant 30 minutes (Echantillon 1) :

Numéro du pic	Temps de rétention (min) t_r	Nom du composé identifié	Teneur en (%)
1	8.72	α -thujène	0.918
2	8.93	α -pinene	2.997
3	10.16	β -myrcene	0.805
4	10.9	α -terpinene	1.702
5	11.1	p-cymene	35.612
6	11.21	limonene	1.032
7	11.89	γ -terpinene	6.727
8	12.88	linalool	4.973
9	13.02	NI	0.506
10	14.78	borneol	0.477
11	14.9	1-terpinene 4-ol	1.016
12	16.15	thymol methyl ether	1.722
13	17.43	thymol	3.762
14	17.66	carvacrol	37.751

NI : Composé non identifié.

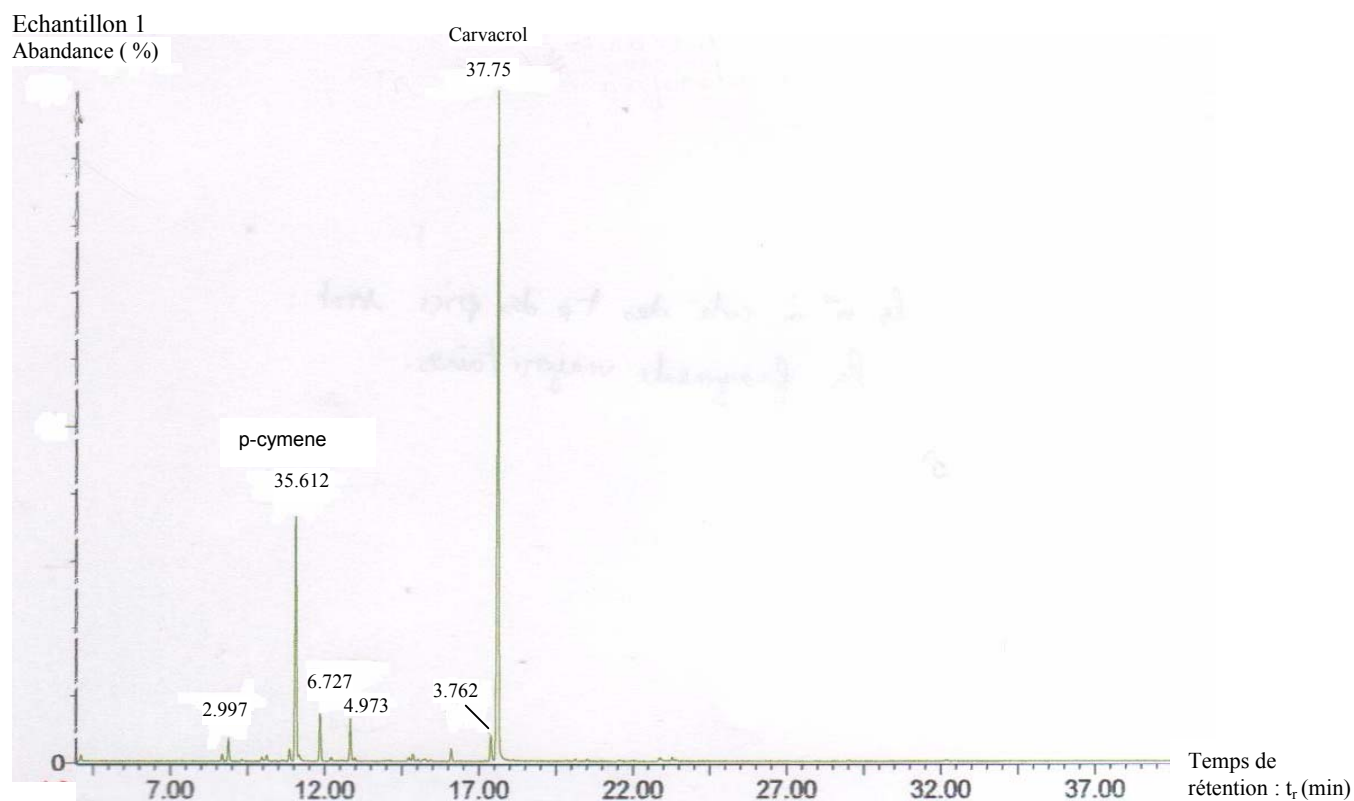


Figure 3. 27 : Profil chromatographique de la fraction d'huile essentielle de *T.vulgaris L.* obtenue après 30 minutes d'hydrodistillation.

Egalement, on a noté que la composition de l'huile change quand la plante est cueillie durant le mois de novembre (Tableau 3.5), car la teneur du composé majoritaire (Carvacrol) est inférieure à celle de l'huile obtenue en mai, il y'a surtout synthèse du précurseur du carvacrol qui est le p- cymène (31.328% pour l'huile de novembre). Cela s'explique par le fait que la récolte de la plante a eu lieu pendant la période recommandée, qui est la période d'inflorescence (Mai, juin).

Tableau 3.5: Composition chimique de l'huile essentielle de *T.vulgaris* récoltée durant le mois de novembre et extraite par hydrodistillation pendant 3 heures (Echantillon 3) :

Numéro du pic	Temps de rétention (min) t_r	Nom du composé identifié	Teneur en (%)
1	8.74	α -thujène	0.867
2	8.93	α -pinene	2.554
3	9.35	camphène	0.184
4	10.01	β -pinene	0.320
5	10.19	β -myrcene	0.788
6	10.93	α -terpinene	0.640
7	11.12	p-cymene	31.328
8	11.23	limonene	0.259
9	11.91	γ -terpinene	2.384
10	12.9	linalool	1.847
11	13.04	NI	0.129
12	14.79	borneol	0.512
13	14.93	1-terpinene 4-ol	0.572
14	15.09	NI	0.162
15	15.51	dihydrocarvone-trans	0.106
16	16.18	thymol methyl ether	2.194
17	16.4	carvone	0.158
18	17.46	thymol	7.657
19	17.66	carvacrol	46.215
20	20.2	caryophyllene	0.192
21	23.34	spathulenol	0.933

NI : Composé non identifié.

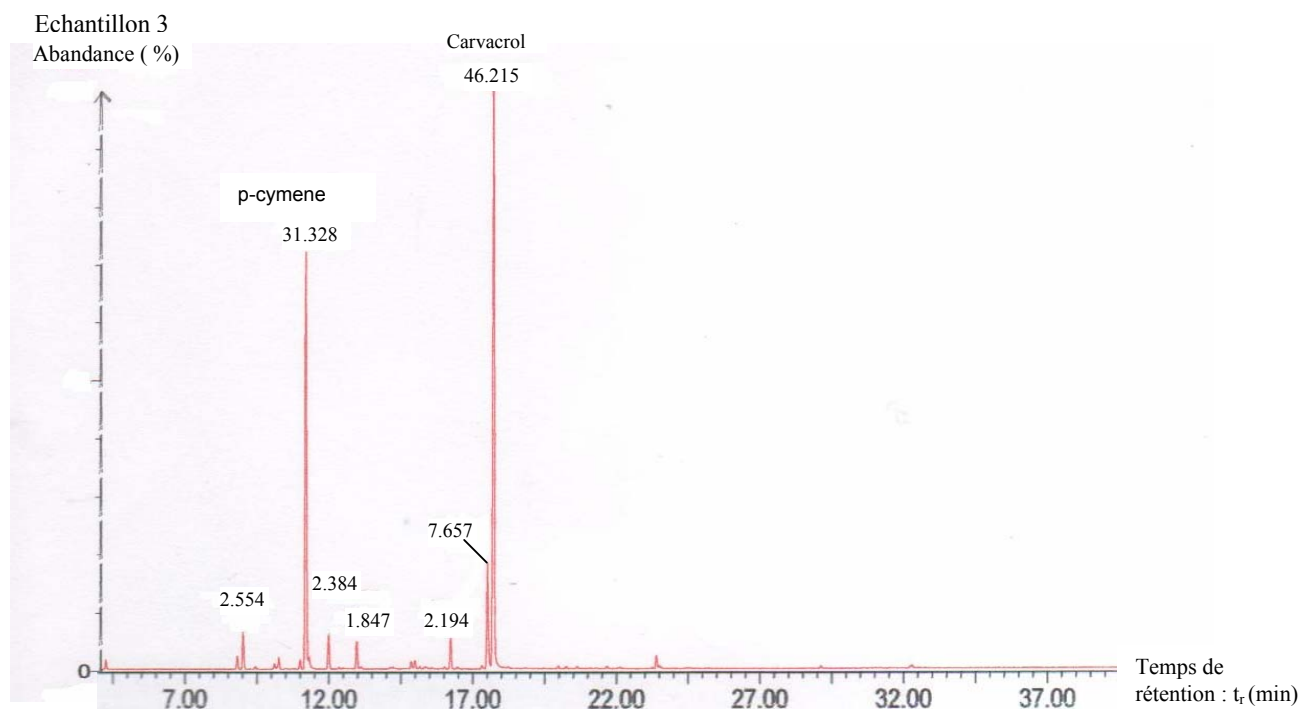


Figure 3.28 : Profil chromatographique de l'huile essentielle extraite pendant trois heures de la plante récoltée durant le mois de Novembre.

Les résultats rapportés dans le tableau 3.6 font ressortir que l'huile essentielle obtenue contient une forte proportion des composés phénoliques (Carvacrol : 63.30%, Thymol: 1.86 %). Donc il s'agit d'un Thym à carvacrol, Cette même constatation a été faite par BOUNATIROU et *al.* (2007) pour *Thymus capitatus* de la Tunisie, et par JULIANO et *al.*, (2000) pour *Thymus berba-barona* de la Sardaigne(Italie), et par TEPE et *al.* (2005) pour *Thymus sipyleus*. Cependant, les analyses faites par BRANTNER et *al.* (2005), MIGUEL et *al.* (2003) et TEPE et *al.* (2005), sur la composition des HE d'autres espèces de Thym, ont montrés que les composants majoritaires sont autres que le carvacrol, ce sont: le geraniol, α -muurolol, α -pinene et linalool; qui n'ont pas été détectés dans l'huile essentielle que nous avons analysé.

Par ailleurs, on observe que l'huile extraite contient également des composés mono terpéniques (p- Cymène : 21.9%, γ - Terpinène 1.459%), et peu de cétones.

On remarque que la plupart des composés identifiés dans l'huile essentielle extraite des feuilles de *Thymus vulgaris* de Chlef (α -pinene, camphène, β -pinene,

β -myrcene, α -terpinene, limonene, γ -terpinene, linalool, p-cymene, thymol, carvacrol, caryophyllene, humulene) font partie de la composition de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* du Mexique. Cependant, les proportions sont nettement différentes en ce qui concerne les composants majoritaires (Thymol 16.6% et Borneol 28.4% pour le Thym du Mexique, Carvacrol 63.3 % et p-cymène 21.9% pour notre plante) [236].

Tableau 3.6: Composition chimique de l'huile essentielle de *T.vulgaris* L. récoltée durant le mois de mai et extraite par hydrodistillation pendant 3 heures (Echantillon 2) :

Numéro du pic	Temps de rétention (min) t_r	Nom du composé identifié	Teneur en (%)
1	8.72	α -thujène	0.814
2	8.93	α -pinene	2.330
3	9.35	camphène	0.179
4	10.02	β -pinene	0.322
5	10.17	β -myrcene	0.375
6	10.91	α -terpinene	0.723
7	11.11	p-cymene	21.908
8	11.21	limonene	0.751
9	11.91	γ -terpinene	1.459
10	12.89	linalool	2.771
11	13.04	NI	0.274
12	14.79	borneol	0.249
13	14.92	1-terpinene 4-ol	0.522
14	15.32	dihydrocarvone-cis	0.351
15	15.5	dihydrocarvone-trans	0.135
16	16.16	thymol methyl ether	1.197
17	17.45	thymol	1.867
18	17.67	carvacrol	63.306
19	20.2	caryophyllene	0.242
20	20.58	humulene	0.223

NI : Composé non identifié.

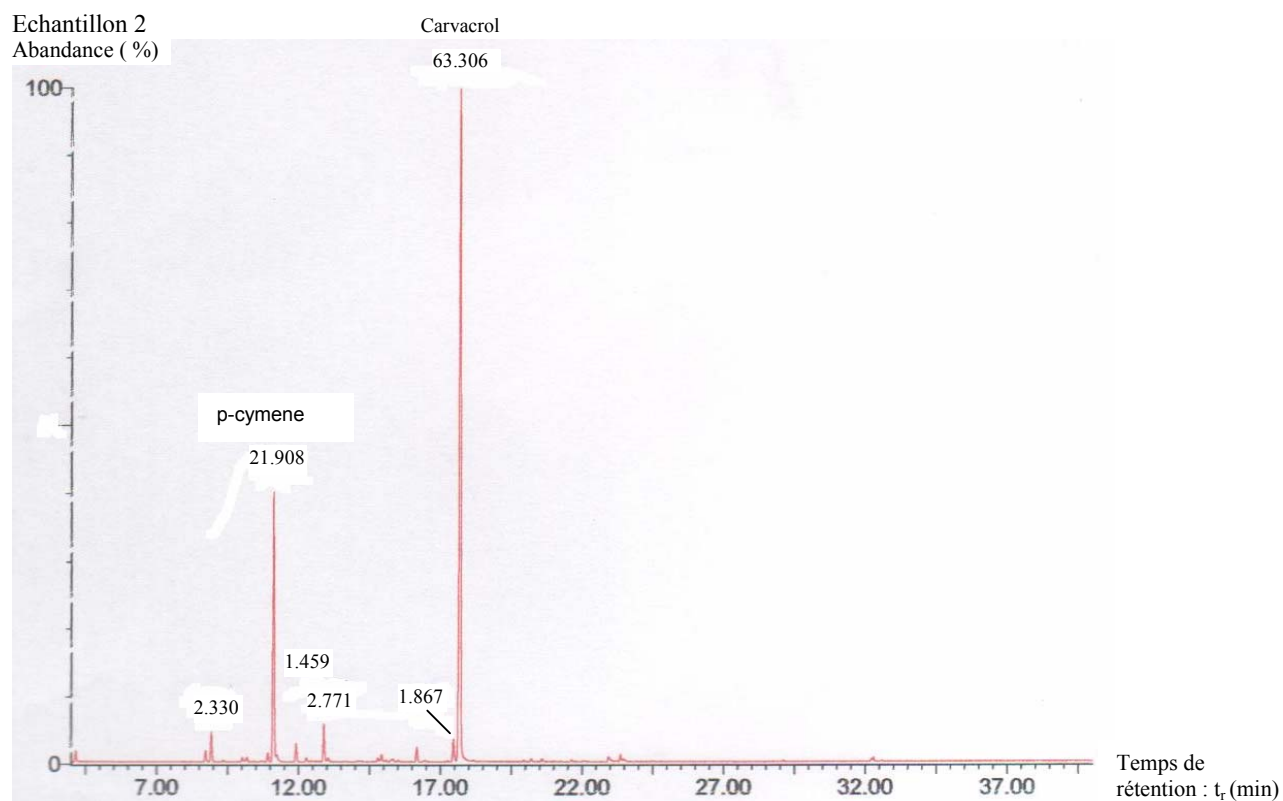


Figure 3.29 : Profil chromatographique de la fraction d'huile essentielle de *T. vulgaris* L. obtenue après trois heures d'hydrodistillation.

La comparaison de l'huile essentielle de notre plante avec celle extraite à partir du Thym de l'Iran a montré que les deux HE contiennent les mêmes composants majoritaires mais à des proportions variables. Il s'agit donc du même chémotype (Thym à carvacrol) car l'HE du Thym de l'Iran contient du carvacrol (85.94 %), thymol (3.33%), p-cymene (3.16%), γ -terpinene (1.80%) et le borneol (1.33%) [220].

Cependant, nous avons trouvé du myrcène et du caryophyllène en faibles proportions (0.375% et 0.242%), bien que ceux-ci soient les composants majoritaires dans les huiles essentielles de certaines espèces de *Thymus* incluant le *Thymus capitatus* [35], *Thymus bracteosus* [37], *Thymus mastichina* [172] et *Thymus camphorates* [173].

3.3.2.2.4. Etude de la toxicité de l'Huile essentielle de *Thymus vulgaris* L.

3.3.2.2.4.1. Détermination de la toxicité aigue de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. administrée par voie orale (DL50)

Les observations sont faites quotidiennement. Les signes importants de morbidité et la mortalité sont notés. A l'issue de la période d'observation, les signes de morbidité n'ont pas été exploités, mais les taux de mortalité sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau 3.7 : Relation entre le taux de mortalité et la dose d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. :

Dose (g / Kg)	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4
Nombre d'animaux utilisés	6	6	6	6	6	6	6
Nombre d'animaux morts	0	2	4	4	6	6	6
Taux de mortalité (%)	0 %	33.33 %	66.66 %	66.66 %	100 %	100 %	100 %
A : différence entre deux doses successives (g)	0.25	0.25	0.5	0.5	-	-	
B : moyenne des nombres de morts de deux doses successives	1	3	4	5	-	-	
A × B	0.25	0.75	2	2.5	-	-	
$\sum A \times B$	5.5						

$$DL_{50} = DL_{100} - \sum A \times B / n \quad (n: \text{étant le nombre de souris par lot : } n=6)$$

Application numérique :

$$DL_{50} = 2 - (5.5 / 6)$$

Après calcul, le résultat trouvé est :

$DL_{50} = 1.08 \text{ g / Kg.}$

Cette dose (1.08 g /Kg) correspond en volume à 1.16 ml / Kg.

En se référant à l'échelle de Hodge et Sterner (Tableau n° 2.3), on déduit que l'huile essentielle est légèrement toxique (L'indice de toxicité étant 4).

Discussion :

La DL_{50} trouvée est nettement inférieure à celle avancée par KUMAR et *al.* (2008) pour l'HE de *Thymus vulgaris* de l'Inde qui est de 7.142 ml/kg, et celle trouvée par BARNES et *al.* (2007) pour le *T. Vulgaris* de France qui est de 2.84 g / Kg.

3.3.2.2.4.2. Evaluation de la tolérance cutanée in vivo

Les résultats obtenus (tableau 3.8) sont comparés avec les valeurs indiquées dans l'échelle d'appréciation de Draize (tableau 3.9).

Ces résultats nous permettent de classer l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. parmi les huiles très irritantes. Cependant, à l'état dilué le pouvoir irritant de cette huile diminue, elle devient légèrement irritante à une concentration de 10%, et non irritante à une concentration égale ou en dessous de 1%. En effet, Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus par PETER (2004).

Tableau 3.8 : Calcul de l'indice d'irritation primaire cutané (IP) :

Dilution d'HE	Pure (Solution mère)	10%	1%	0.02%	0.002%	0.0006%
Indice d'irritation primaire (IP)	6.5	1.25	0.5	0	0	0

Tableau 3.9 : Classification des produits en fonction de leur Indice d'irritation primaire cutanée (IP) :

Classification du produit testé	Indice d'irritation primaire cutanée (IP)
Non irritant	$IP \leq 0,5$
Légèrement irritant	$0,5 < IP \leq 2$
Irritant	$2 < IP \leq 5$
Très Irritant	$5 < IP \leq 8$

Le pouvoir de l'huile essentielle d'irriter la peau est lié à sa composition en substances irritantes tel que le Thymol et le carvacrol, α et β - pinène, borneol, caryophyllene, γ -terpinene, limonene, linalool, myrcene, p-cymene et 1-terpinene 4-ol [19 ; 155 ; 215 ; 192].

3.4. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* L.

3.4.1. Evaluation de l'activité antifongique

3.4.1.1. L'effet des huiles essentielles de *T. vulgaris* L. sur les champignons à thalle mycélien

3.4.1.1.1. Résultats des tests préliminaires

Les tests préliminaires sont réalisés avec les solvants suivants : Le tween 20 et l'éther diéthylique, et à différentes concentrations. Les résultats obtenus ont été reportés dans les tableaux : 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14 et les figures 3.30, 3.32, 3.34, 3.36, 3.38 pour l'éther diéthylique et les figures 3.31, 3.33, 3.35, 3.37, 3.39 pour le tween 20.

3.4.1.1.1.1. Influence des solvants sur la croissance de *Nectria galligena*

Cette souche de champignon a été mise en contact avec deux solvants différents, les résultats obtenus de cette croissance sont reportés dans le tableau 3.10 et les figures 3.30 et 3.31.

On constate que les deux solvants (éter diéthylique et tween 20) exercent une certaine répression sur la croissance mycélienne du champignon

Nectria galligena. Elle est de 5.25% pour l'ether diéthylique et de 15,22% pour le tween 20.

Tableau 3.10 : Influence des solvants sur La croissance de *Nectria galligena* (Diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)

Le temps (Jours)		1	2	3	4	5	6	7
Solvant	Dilutions							
Ether Diéthylique	0,0799%	1,9	2,4	3,2	5,2	6,5	7	7,3
	0,199%	1,5	2,5	3,1	4,5	6,9	7	7,2
	0,398%	1,8	2,4	3,2	5	6,9	6,9	7,6
	0,596%	1,6	2,4	3,2	5,2	7,5	7,8	8,6
Tween 20	0,03%	1,3	2,3	3	4,2	5,9	6,3	6,9
	0,159%	2,1	2,8	3,4	4,9	5,9	6,6	7
	0,398%	2,3	2,9	3,4	5	5,7	6,2	6,7
PDA pure	-	1,6	2,5	3,6	6,3	7,8	8	8,1

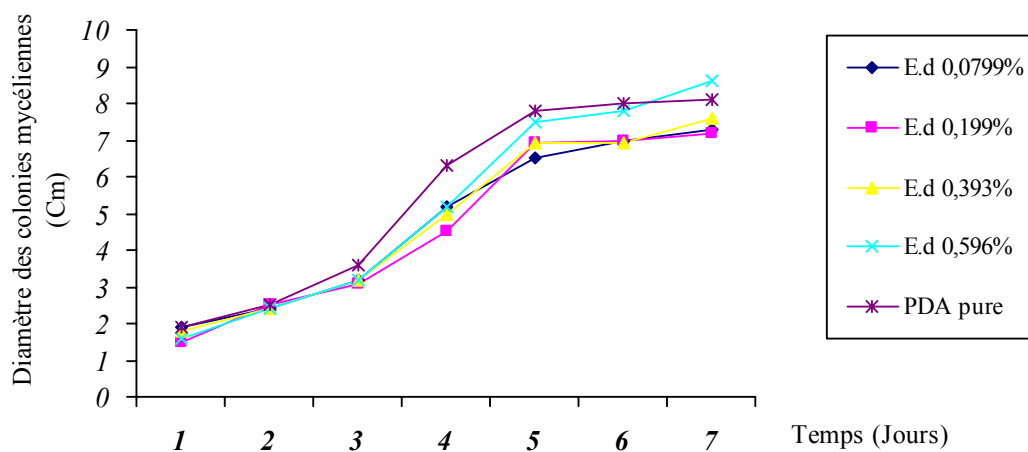


Figure 3.30 : Influence de l'Ether diéthylique sur la croissance de *Nectria galligena*

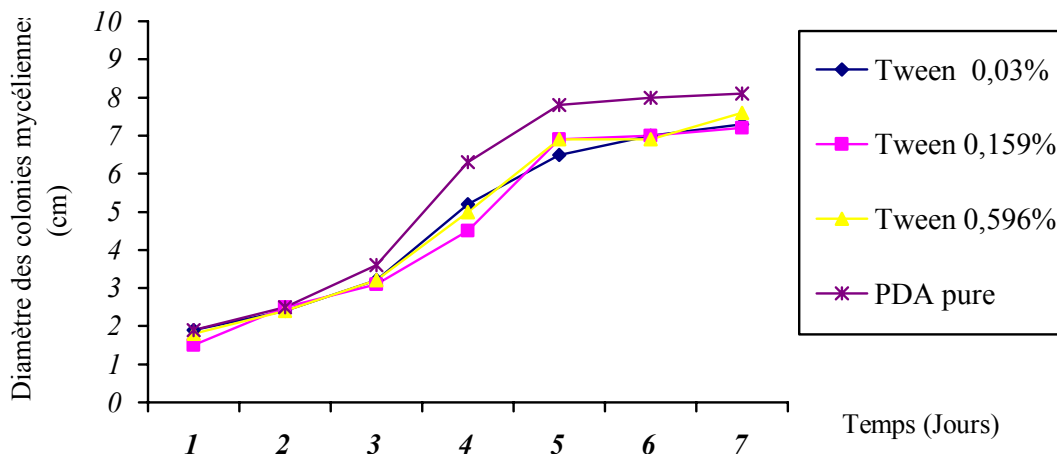


Figure 3.31 : Influence de Tween 20 sur la croissance de *Nectria galligena*

3.4.1.1.1.2. Influence des solvants sur la croissance de *Monilia fructigena*

Nous avons constaté d'après les résultats obtenus (Tableau 3.11 et figures 3.32 et 3.33) que peu ou pas d'action répressive n'est exercée par les deux solvants testés, car toutes les courbes ont presque la même allure et coïncident avec celle de la croissance de *Monilia fructigena* dans le milieu PDA pur (Témoin). On constate également que les diamètres finaux des colonies mycéliennes sont les mêmes pour les deux solvants et le témoin. Donc les solvants utilisés à différentes concentrations n'ont aucune influence sur la croissance de *Monilia fructigena*.

Tableau 3.11 : Influence des solvants sur la croissance de *Monilia fructigena* (Diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)

Le temps (Jours)		1	2	3	4	5	6	7
Solvant	Dilutions							
Ether Diéthylique	0,0799%	1,6	3,9	6,3	9	9	9	9
	0,199%	1,6	3,4	5,3	9	9	9	9
	0,398%	1,5	3,9	6,2	9	9	9	9
	0,596%	1,6	4,5	8,5	9	9	9	9
Tween 20	0,03%	1,6	3,2	6,2	9	9	9	9
	0,159%	1,6	3	6	9	9	9	9
	0,398%	1,7	2,9	4,2	9	9	9	9
PDA pure	-	1,6	3,3	6,2	9	9	9	9

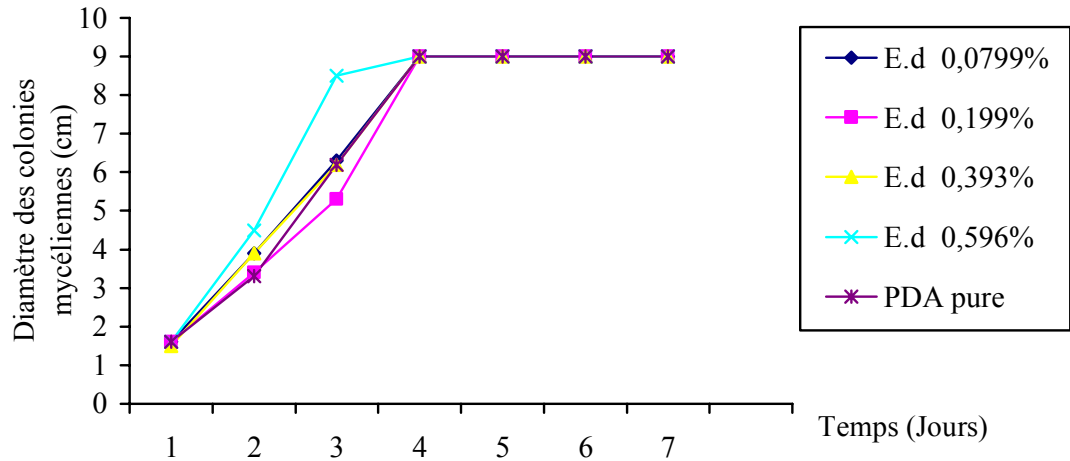


Figure 3.32 : Influence de l'Ether diéthylique sur la croissance de *Monilia fructigena*

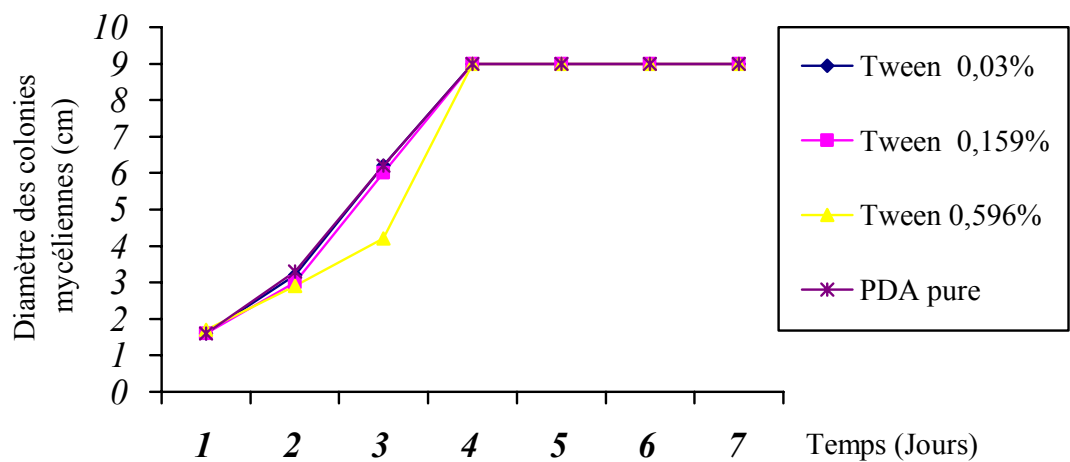


Figure 3.33 : Influence de Tween20 sur la croissance de *Monilia fructigena*.

3.4.1.1.1.3. Influence des solvants sur la croissance de *Venturia inaequalis*

Les diamètres des colonies mycéliennes en contact avec les solvants à différentes concentrations, dépassent légèrement ceux du champignon cultivé dans la gélose PDA non additionné de solvant (témoin) (Tableau 3.12 et figures 3.34 et 3.35). Cela montre que l'éther diéthylique et le tween 20 ont une action positive sur la croissance de *Venturia inaequalis*.

Dans le cas de ce champignon, l'utilisation du tween 20 ou de l'éther diéthylique comme solubilisant de l'huile essentielle pourrait influencer la valeur de la Concentration Minimale Inhibitrice.

Tableau 3.12 : Influence de solvants sur La croissance de *Venturia inaequalis* (Diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)

Le temps (Jours)		1	2	3	4	5	6	7
Solvant	Dilutions							
Ether Diéthylique	0,0799%	1	1,9	2,6	3,4	6	6,3	7
	0,199%	1	2	3	3,8	5	6,3	7
	0,398%	1	1,8	2,2	4,5	5,4	6	6,5
	0,596%	1	2	3	4,9	5,5	6	6,9
Tween 20	0,03%	1	2,5	3,3	5,3	6,5	6	7,5
	0,159%	1,8	1,8	2,2	4,8	6	7	7,8
	0,398%	0,9	1,9	2,6	5,2	7	7,1	7,8
PDA pure		1	2	2,5	4,3	5	5,8	6,3

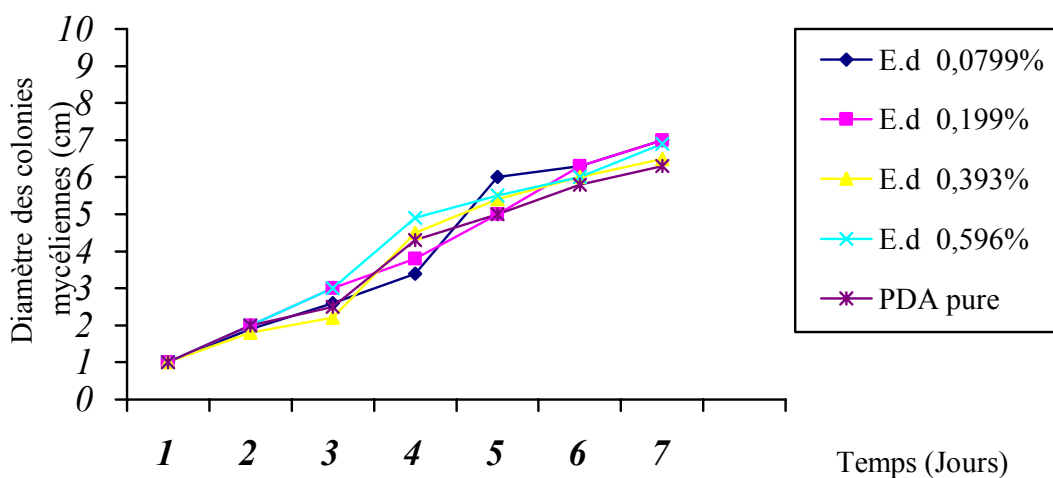


Figure 3.34 : Influence de l'Ether diéthylique sur la croissance de *Venturia inaequalis*

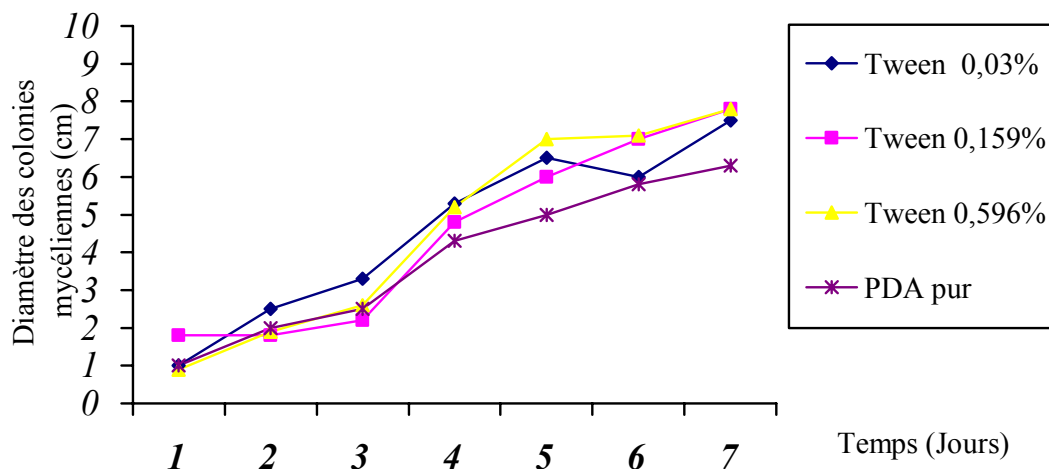


Figure 3.35 : Influence de Tween20 sur la croissance de *Venturia inaequalis*

3.4.1.1.1.4. Influence des solvants sur la croissance de *Peronospora graminea* (Isolat 35 BMS 1)

Les résultats illustrés par le tableau 3.13 et les figures 3.36 et 3.37, montrent que la souche se développe normalement à différentes concentrations d'éther diéthylique, cependant, avec le tween 20 dilué à 0.03%, 0.159% et 0.398% nous avons noté une légère stimulation de la croissance mycélienne, estimée à 7.6 %.

Tableau 3.13 : Influence de solvants sur la croissance de *Peronospora graminea* (Isolat 35 BMS 1) (Diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)

Le temps (Jours)		1	2	3	4	5	6	7
Solvant	Dilutions							
Ether diéthylique	0,0799%	1,4	2,3	3,1	5	6,5	6,9	7,3
	0,199%	1,4	2,3	3,1	5,3	6,9	7	7,3
	0,398%	1,3	2,3	3,1	5,2	6,5	7	7,3
	0,596%	1,4	2,5	3,4	5,1	5,7	6,2	7,8
Tween 20	0,03%	1,7	2,9	3,7	5,2	6,9	7,2	7,8
	0,159%	1,5	2,9	3,7	5,1	6,7	7,2	7,9
	0,398%	1,4	2,9	3,7	6	7,5	7,8	8,2
PDA pure		1,4	2,7	3,7	5,5	6,5	7	7,4

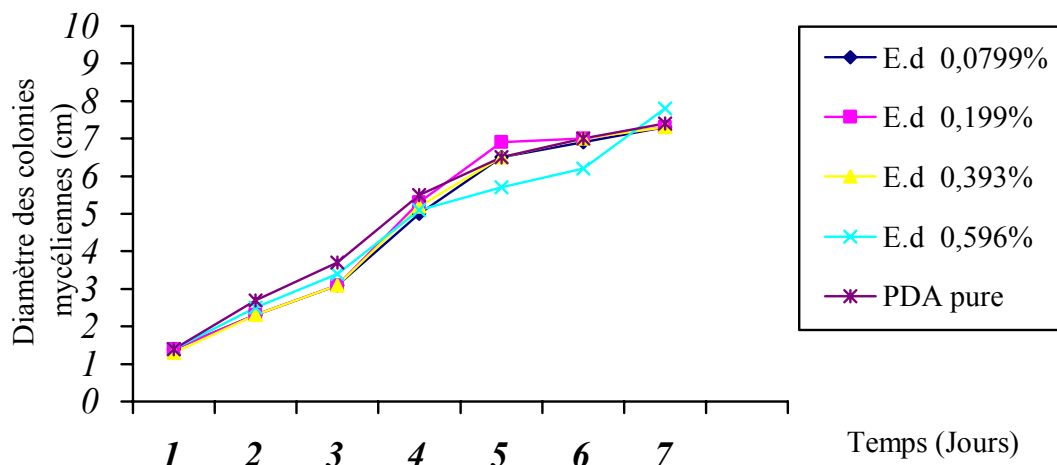


Figure 3.36 : Influence de l'Ether diéthylique sur la croissance de *Peronospora gramineae* (Isolat 35 BMS 1)

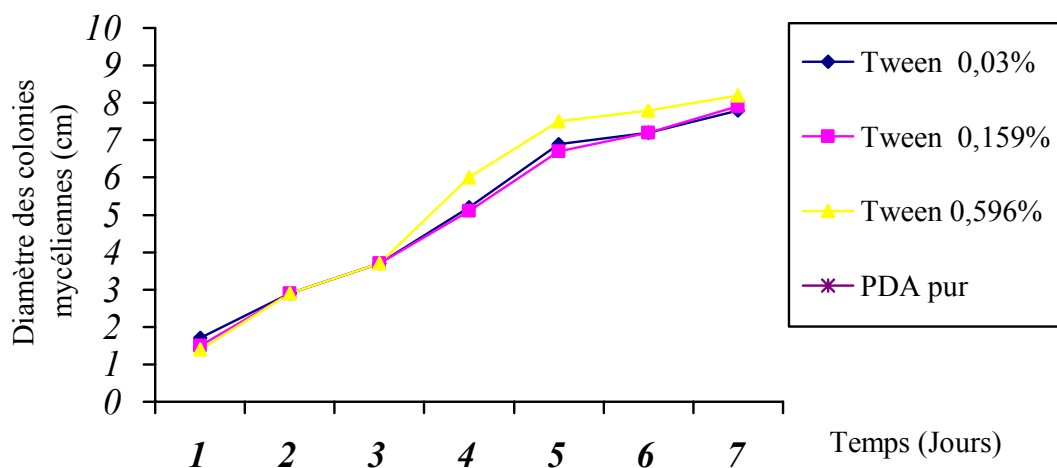


Figure 3.37 : Influence de Tween20 sur la croissance de *Peronospora gramineae* (Isolat 35 BMS 1)

3.4.1.1.1.5. Influence des solvants sur la croissance de *Peronospora gramineae* (Isolat 16 OUS R3)

L'effet stimulateur de la croissance mycélienne par les deux solvants n'apparaît qu'à partir du 6^{ème} jour (tableau 3.14, figures 3.38 et 3.39). Il est évalué à 15.32 % exercée par l'éther diéthylique et 11.29 % exercée par le tween80. Cependant, cet effet n'est pas considérable par rapport à celui obtenu par le tween 20 chez *Venturia inaequalis* estimé à 22.22 %.

Tableau 3.14 : Influence des solvants sur la croissance de *Peronospora gramineae* (Isolat 16 OUS R3) (Diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)

Le temps (Jours)		1	2	3	4	5	6	7
Solvant	Dilutions							
Ether Diéthylique	0,0799%	1,2	2,1	2,9	4,5	5,5	6	6,5
	0,199%	1,2	2,1	2,9	4,5	6	7	7,8
	0,398%	1,2	2,1	2,9	5	5,5	6	6,8
	0,596%	1,4	2,3	3	4,7	6	7	7,5
Tween 20	0,03%	0,9	2,8	3,6	4	6,2	6,6	7,2
	0,159%	1,2	2,8	3,6	4,4	5,8	6	6,7
	0,398%	1,2	2,7	3,2	4,4	5,7	6,2	6,8
PDA pure		1	2,5	3,2	4,2	5,5	6	6,2

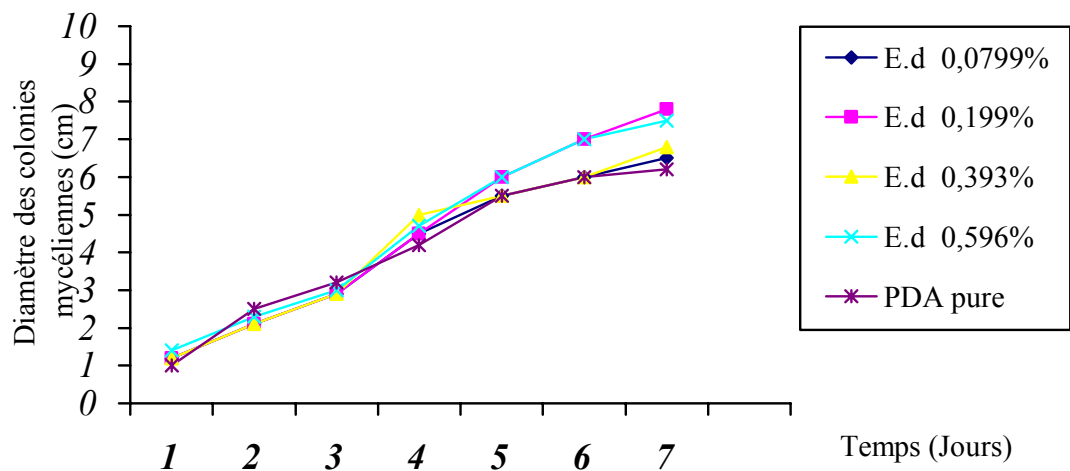


Figure 3.38 : Influence de l'Ether diéthylique sur la croissance de *Peronospora gramineae* (Isolat 16 OUS R3)

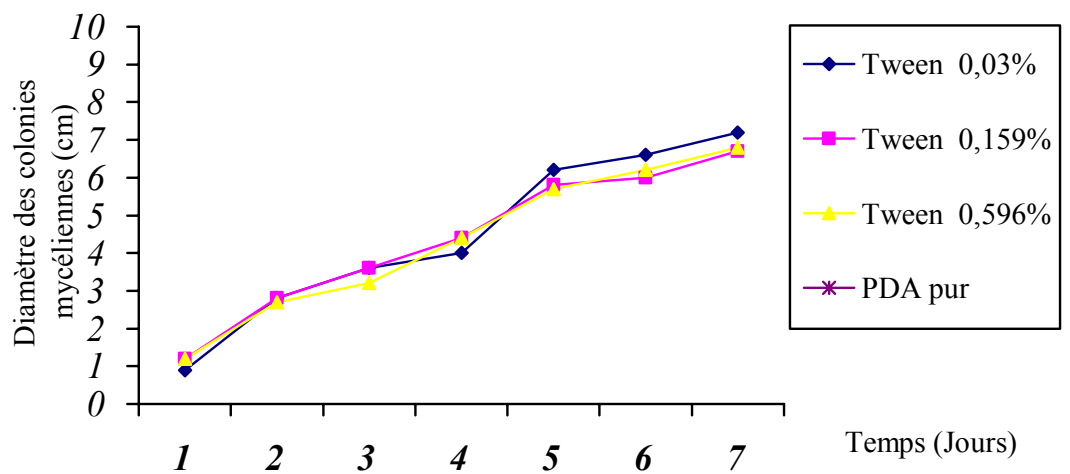


Figure 3.39 : Influence de Tween20 sur la croissance de *Peronospora gramineae* (Isolat 16 OUS R3)

L'ensemble des résultats obtenus montre que l'éther diéthylique est le solvant le plus approprié en raison de sa faible influence sur la croissance des colonies de champignons par rapport au tween 20 (Sauf dans le cas de *Peronospora graminiae* isolat 16 OUS R3).

3.4.1.1.2. Résultats de l'activité antifongique testée par la méthode de surfusion de l'H.E de *Thymus vulgaris* L.

Les résultats ont été reportés sur cinq tableaux, correspondant chacun à une souche de champignon (Tableaux 3.15, 3.16, 3.17, 3.18 et 3.19) et sur les figures 3.40, 3.41, 3.42, 3.43, 3.44.

La croissance des colonies mycéliennes des cinq champignons mis en contact avec l'H.E a été comparée avec celle des champignons mis en culture dans le PDA non additionnée d'H.E (témoin).

L'analyse des résultats rapportés dans le tableau 3.15 et la figure 3.40 indique que la croissance mycélienne de *Monilia fructigena* a été réduite au 1/2 pour la dilution 0,05% par rapport au témoin (PDA pur). Elle a été par contre, totalement inhibée par les dilutions les plus fortes (0,249%, 0,398% et 0,596%). Ces résultats indiquent que la CMI correspond à 0,05%. La même concentration minimale en H.E de *Lavandula Stoechas* a inhibé la croissance de cette même espèce de champignon [5].

Tableau 3.15 : Influence de l'H.E de *Thymus vulgaris* L. sur la croissance de *Monilia fructigena* (Les diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre).

Temps (Jours) \ Les dilutions (%)	1	2	3	4	5	6	7
0,05	-	-	1,1	1,6	2,7	3,2	4,8
0,249	-	-	-	-	-	-	-
0,398	-	-	-	-	-	-	-
0,596	-	-	-	-	-	-	-
PDA pur	1,6	3,3	6,2	9	9	9	9

(-) : Pas de croissance mycélienne.

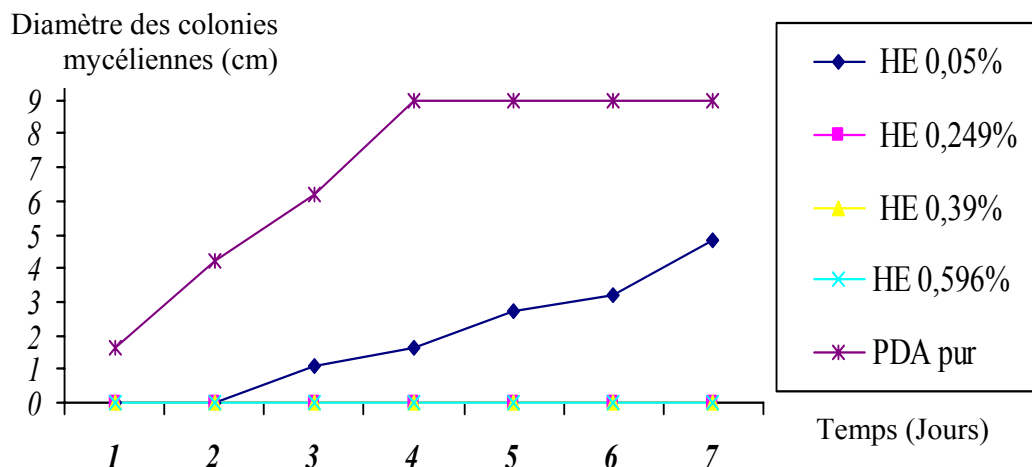


Figure 3.40 : Evolution de la croissance mycélienne de *Monilia fructigena* en fonction du temps et du traitement.

D'après les tableaux 3.16, 3.17, 3.18 et 3.19 et les figures 3.41, 3.42, 3.43 et 3.44 nous constatons que toutes les concentrations de l'H.E de l'espèce de Thym étudiée ont une action fongicide sur les quatre espèces de champignons étudiée, car aucune croissance mycélienne n'a été observée. Donc la concentration minimale inhibitrice de ces quatre champignons est inférieure à 0,05%.

Tableau 3.16: Evaluation de l'effet de l'H.E de *Thymus vulgaris L.* sur la croissance de *Nectria galligena* (Les diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)

Temps (Jours) \ Les dilutions (%)	1	2	3	4	5	6	7
0,05	-	-	-	-	-	-	-
0,249	-	-	-	-	-	-	-
0,398	-	-	-	-	-	-	-
0,596	-	-	-	-	-	-	-
PDA pur	1,9	2,5	3,6	6,3	7,8	8	8,1

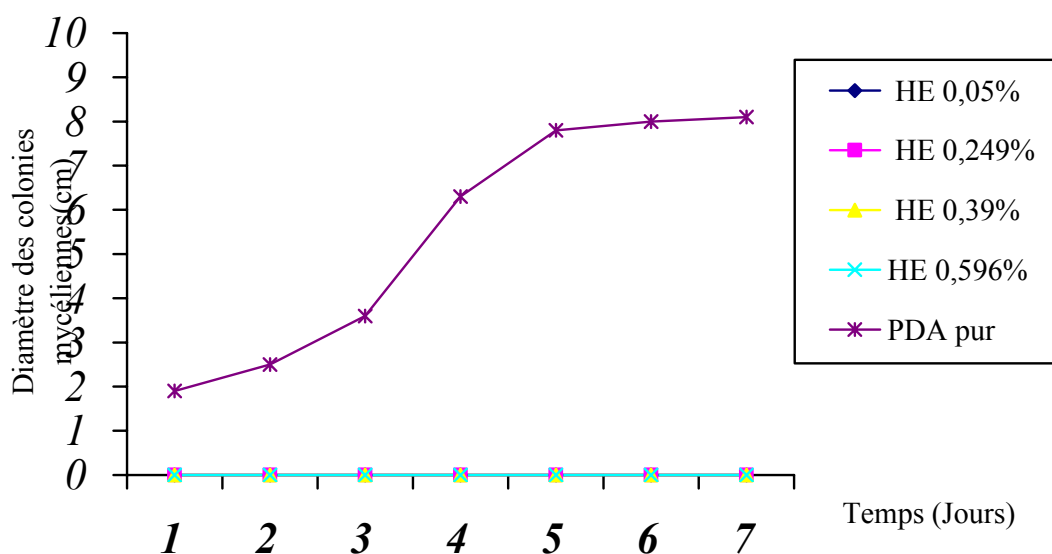


Figure 3.41 : Evolution de la croissance mycélienne de *Nectria galligena* en fonction des jours

Ces résultats montrent une efficacité antifongique très élevée de l'H.E du Thym sur les espèces de champignons étudiées.

Tableau 3.17 : Influence de l'H.E de *Thymus vulgaris* L. sur la croissance de *Venturia inaequalis* (Les diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)

Temps (Jours) \ Les dilutions (%)	1	2	3	4	5	6	7
0,05	-	-	-	-	-	-	-
0,249	-	-	-	-	-	-	-
0,398	-	-	-	-	-	-	-
0,596	-	-	-	-	-	-	-
PDA pur	1	2	2,5	4,3	5	5,8	6,3

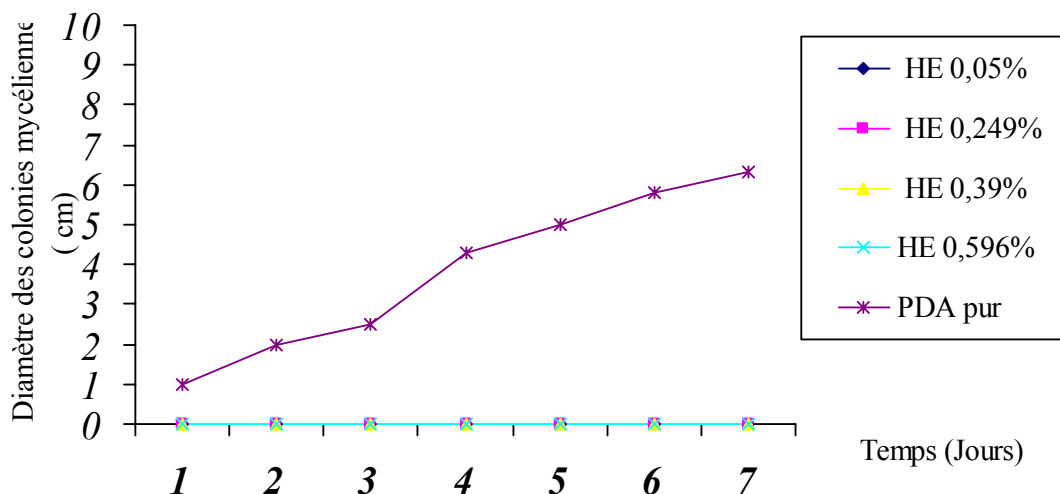


Figure 3.42 : Evolution de la croissance mycélienne de *Venturia inaequalis* en fonction des jours.

L'activité antifongique de l'huile extraite à partir de l'espèce de Thym étudiée est nettement supérieure à celle observée par AICHOUNI et *al.* (2008), pour l'H.E de *Lavandula Stoechas* testée contre ces mêmes champignons ; cette dernière ayant une CMI égale à 0,39% pour *Nectria galligena* et égale à 0.59 % aussi bien pour *Venturia inaequalis* que les deux pathovars de *Peronospora graminea*.

Tableau 3.18 : Influence de l'H.E de *Thymus vulgaris* L. sur la croissance de *Peronospora graminea* (Isolat 35 BMS 1) (Les diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre).

Temps (Jours) \ Les dilutions (%)	1	2	3	4	5	6	7
0,05	-	-	-	-	-	-	-
0,249	-	-	-	-	-	-	-
0,398	-	-	-	-	-	-	-
0,596	-	-	-	-	-	-	-
PDA pur	1,4	2,1	3,7	5,5	6,5	7	7,4

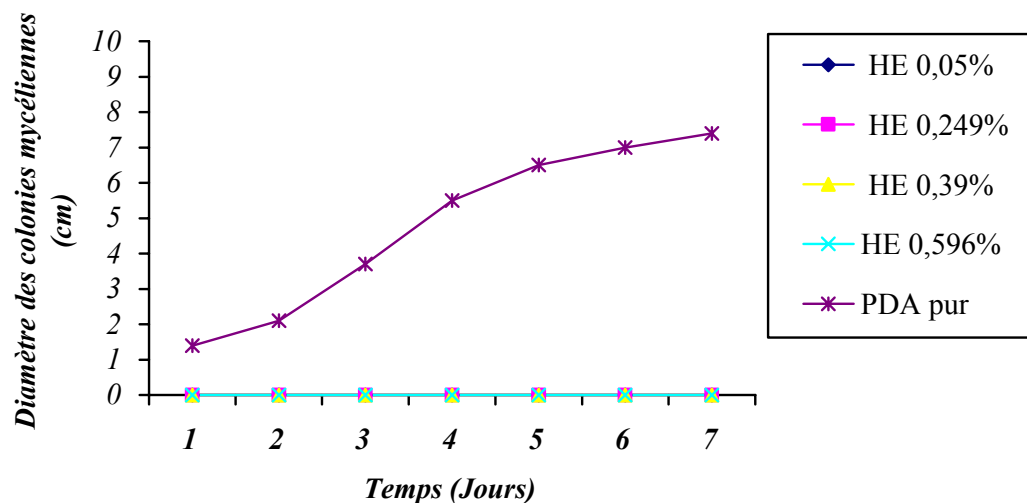


Figure 3.43 : Evolution de la croissance mycélienne de *Peronospora graminea* (Isolat 35 BMS 1) en fonction des jours.

Selon COWMAN (1999), 60 % des composés volatils des huiles essentielles sont dotés d'activité inhibitrice de la croissance des organismes fongiques.

Tableau 3.19 : Influence de l'H.E de *Thymus vulgaris L.* sur la croissance de *Peronospora graminea* (Isolat 16 OUS R3) (Les diamètres des colonies mycéliennes exprimés en centimètre)

Temps (Jours) \ Les dilutions (%)	Temps (Jours)						
	1	2	3	4	5	6	7
0,05	-	-	-	-	-	-	-
0,249	-	-	-	-	-	-	-
0,398	-	-	-	-	-	-	-
0,596	-	-	-	-	-	-	-
PDA pur	1	2,5	3,2	4,2	5,5	6	6,2

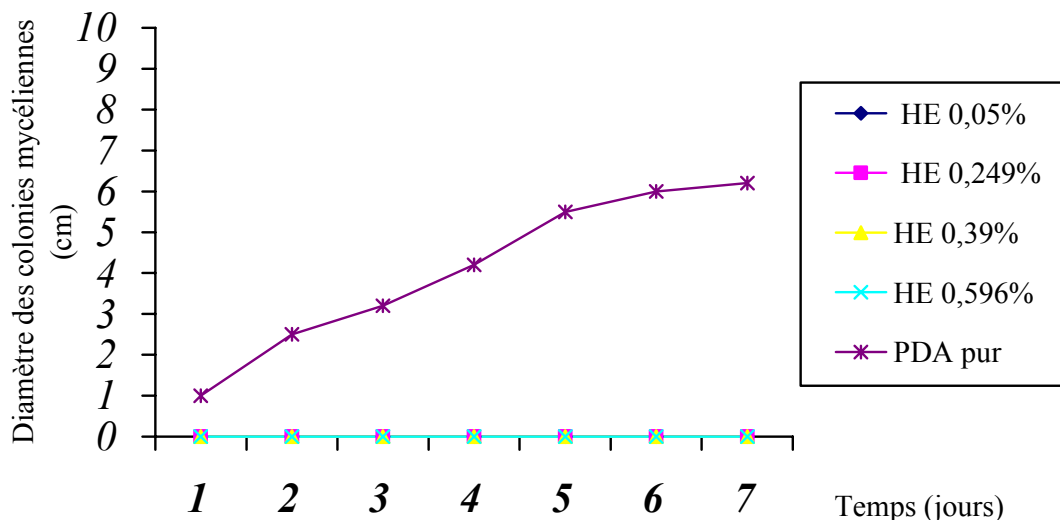


Figure 3.44 : Evolution de la croissance mycélienne de *Peronospora graminea* (Isolat 16 OUS R3) en fonction des jours.

L'efficacité des terpènes et des terpenoïdes contre les champignons pathogènes a été mise en évidence par plusieurs auteurs [15; 117; 149; 207; 208; 242; 248]. Cependant, leur mécanisme d'action reste à ce jour peu élucidé, mais il semblerait qu'ils contribuent à la rupture des membranes par leurs composés lipophiles [167].

L'efficacité élevée de l'huile essentielle du Thym contre les champignons testés, sera due à sa haute teneur en composés terpéniques (72.77%) tel que le limonène qui est un monoterpène, le carvacrol et le thymol (composé monoterpénique phénolique), l' α - et β - pinène (monoterpènes cycliques), le linalool, α - terpène, borneol, camphène, limonène (composés monoterpéniques), le caryophyllène et l'humulène (Sesquiterpènes) [223]. Elle serait également due à sa teneur en substances fongicides tel que : myrcène et p-cymène [116; 143].

3.4.1.2. Effet de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux de *T. vulgaris* L. sur la croissance des levures

La méthode utilisée pour ces espèces est celle de la diffusion sur agar. Les résultats de ce test ont été regroupés sous forme de tableaux exprimant les inhibitions des colonies des levures causées par les différentes concentrations des extraits végétaux (Tableaux 3.20 et 3.21, figures 3.45 et 3.46).

L'incubation de la souche avec le myristate d'isopropyl n'a donnée aucune zone d'inhibition, donc ce dernier solvant dans lequel nous avons dilué l'huile essentielle, n'a aucun effet inhibiteur sur la croissance de *Candida albicans*.

D'après nos résultats, nous avons constaté que les deux extraits végétaux ont agit sur la croissance de la souche de levure testée et que l'huile essentielle est plus efficace contre Candida (CMI égale à 1.25 %) comparée avec l'extrait aqueux. L'effet candidicide de ce dernier n'est apparu qu'à la concentration de 15 % (CMI) (Tableau 3.20).

Tableau 3.20 : Mesure de l'inhibition de la croissance de *Candida albicans* par l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* L.

Concentrations (%)	0.125	1.25	2.5	5	10	15	20	25	30
Diamètre des zones d'inhibitions (mm)	-	-	-	-	-	11	14	19	22

Tableau 3.21 : Mesure de l'inhibition de la croissance de *Candida albicans* par l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L.

Concentrations (%)	0.01	0.025	0.03	0.05	0.1	0.25	0.5	1	1.25	2	2.5	5	10
Diamètre des zones d'inhibitions (mm)	-	-	-	-	-	-	-	-	11	12	12	13	16

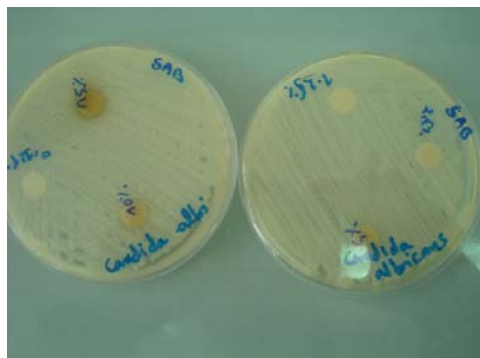


Figure 3.45 : Zones d'inhibition créée par l'action de l'extrait aqueux (Originale, 2009).

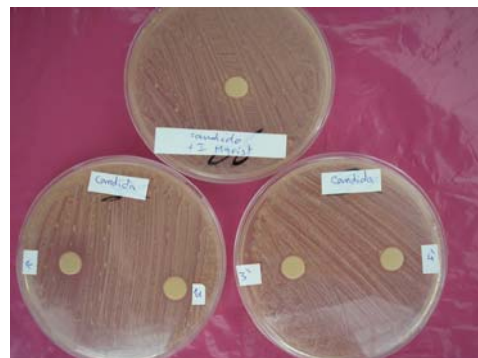


Figure 3.46 : Zones d'inhibition créée par l'action de l'huile essentielle (Originale, 2009).

L'action antifongique des huiles essentielles 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 donc la mort de la levure [62]. En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures [105].

Des tests sur l'influence des huiles essentielles de deux espèces de Thym du Portugal sur la croissance de *Candida*, réalisés par FALEIRO et al. (2003), ont révélés qu'à l'état pur, l'huile extraite de *T. mastichina* donne une zone d'inhibition de 14 mm de diamètre, et celle extraite de *T. camphoratus* a donné un diamètre de 6.6 mm. Ces valeurs sont nettement inférieures à la valeur que nous avons obtenu avec l'HE de la plante testée qui est égale à 16 mm, et ce malgré une dilution à 10 %, ce qui montre qu'elle a une forte activité candidicide comparée à celles des espèces de Thym Portugais.

Les composants qui semblent être à l'origine de l'activité candidicide du Thym sont nombreux et constituent 67.54 % de l'HE étudiée, tel que le β - pinene, Borneol, Carvacrol, caryophyllene, Thymol, limonène et linalool [158; 153].

3.4.2. L'effet des huiles essentielles et de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* L. sur la croissance des bactéries

Les mesures de l'activité inhibitrice des huiles essentielles et des extraits aqueux de la plante étudiée ont été effectuées par la méthode de diffusion sur gélose. Cette méthode permet d'évaluer l'effet des molécules bioactives sur des germes considérés comme pathogènes.

Les résultats expérimentaux de l'effet antimicrobien sont consignés dans les tableaux 3.22, 3.23 et 3.24. Il en ressort que l'huile essentielle du Thym est très active contre les souches bactériennes testées avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) variant de 0.01 et 25 %. Quant à l'extrait aqueux, seules les croissances de *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutéa* et *Bacillus subtilis* ont été inhibées par ce dernier, les CMI étant respectivement de 15 %, 5 % et 20%.

La souche la plus sensible à l'action de l'huile essentielle est *Staphylococcus aureus* avec une CMI égale à 0.01%, cette valeur est inférieure à celle retrouvée par HAMMER et al. (1999) pour l'H.E de *Thymus vulgaris* L. d'Australie qui est de 0.25 %.

Le diamètre de la zone d'inhibition de *S. aureus* par la concentration d'huile à 10 % est évalué à 20 mm, valeur considérée supérieure à celle des inhibitions provoquées par les HE pures de *T. mastinchina* et *T. camphoratus* du Portugal, qui sont respectivement de 15.7 et 7.3 mm [95], tandis qu'elle est inférieure à celle de *T. vulgaris* de la Grande- Bretagne laquelle dépasse 90 mm [83].

Trois souches de référence d'*E. Coli* ont été testées avec les HE de *T. Mastinchina*, *T. camphoratus* et deux espèces de *T. vulgaris* L. (De l'Allemagne et de la Grande- Bretagne); les diamètres des zones d'inhibitions résultant de l'action de ces HE à l'état pure sont respectivement : 14 mm, 9.6 mm, 25.7 mm et 32.4 mm [115; 95; 83]. On remarque que ces résultats sont inférieurs à celui que nous avons obtenu (31 mm) sauf pour le cas du Thym de la Grande- Bretagne.

Tableau 3.22 : Détermination de la sensibilité des souches bactériennes aux huiles essentielles de *Thymus vulgaris L.* (Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en millimètre)

	Myristate d'isopropyl(Témoin négatif)	Huile essentielle de <i>Thymus vulgaris L.</i> (Dilutions exprimées en %)																		
		0.01	0.025	0.03	0.05	0.1	0.25	0.5	1	1.25	2	2.5	5	10	25	27	30	40	50	Pure
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	S	S	S	23	37
<i>Escherichia Coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	14	17	23	31
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	12	12	12.5	13	13	13.5	13.5	14	14	14.5	15	20	20	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus épidermidis</i>	-	-	-	11	11	12	12	13	13	13	13.5	14	22	36	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
<i>Sarcina lutea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	19	35	S	S	S	45	S
<i>Bacillus Subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	11	11	12	13	17	33	S	S	S	S	S	S

(-) : Absence d'inhibition de la croissance bactérienne (Souche résistante à l'effet de l'huile essentielle).

S : Présence de zone d'inhibition (Souche sensible).

Pseudomonas aeruginosa a montré plus de résistance à l'action de l'HE qui n'a agit sur sa croissance qu'à l'état pur, les autres souches étant plus sensibles, les CMI sont les suivantes: 0.03 % pour *Staphylococcus épidermidis*, 1 % pour *Bacillus subtilis* (Diamètre d'inhibition avec l'HE à 10 % est de 33 mm), 5 % pour *Sarcina lutea* et 25 % pour *Klebsiella pneumoniae* (le diamètre d'inhibition de cette dernière par l'HE pure est de 37 mm, c'est le plus élevé comparé avec les autres

souches). Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus par DORMAN et DEANS (2000) pour l'HE du Thym de la Grande- Bretagne utilisée à l'état brute: 23.4 mm pour *Bacillus subtilis* et 31.8 mm pour *Klebsiella pneumoniae*.

Au vu des résultats obtenus et comparés avec les autres espèces , il en ressort que l'HE du Thym de Chlef possède un pouvoir bactéricide plus fort comparé à celui des autres HE extraites des Thymus du Portugal, d'Australie, d'Allemagne et de la Grande- Bretagne.

Tableau 3.23 : Les concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris L.*

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus épidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Sarcina lutea</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Les CMI (%)	25	27	0.01	0.03	100	5	1

Tableau 3.24 : Détermination de la sensibilité des souches bactériennes aux extraits aqueux de *Thymus vulgaris L.* (Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en millimètre)

Espèce Bactérienne	Concentrations (%)									
	0.125	1.25	2.5	5	10	15	20	25	30	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	12	12	12	14	
<i>Staphylococcus épidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Sarcina lutea</i>	-	-	-	14	18	20	20	20	23	
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	25	30	32	

Chaque souche de microorganisme répond de manière variable aux différents composés de l'huile, mais il a été souligné dans plusieurs études que les bactéries à Gram (+) sont plus rapidement inhibées que les bactéries à Gram (-) [246].

Les études réalisées sur l'activité antimicrobienne des composés volatils des huiles essentielles ont montré que 30% de ces composés ont la capacité d'inhiber la croissance des bactéries [61]. Les recherches ont montrées que les terpènes qui constituent la plus grande partie de notre huile essentielle (72.77 %) et les terpenoïdes sont très actifs contre les bactéries [4; 6; 20; 113; 125; 148; 229; 246; 248; 167].

Les flavonoïdes sont des molécules synthétisées par la plante en réponse aux infections microbiennes [80], il ne serait pas donc surprenant de les trouver actifs contre la plupart des microorganismes lors des expérimentations *in vitro*. Leur activité est probablement due à leur capacité de former un complexe avec les protéines microbiennes extracellulaires solubles et de se fixer aux polypeptides de la paroi des cellules bactériennes, comme c'est le cas pour les quinones [256]. En effet, ces derniers sont connus par leur capacité de former des complexes irréversibles avec les acides aminés des protéines, entraînant, l'inactivation de ces dernières et une perte de leurs fonctions biologiques dans les cellules bactériennes. C'est pour cette raison, que le potentiel antibactérien des quinones est très élevé, les sites d'action étant les polypeptides de la paroi et les enzymes liées à la membrane de la cellule bactérienne [61].

Selon CHABOT et *al.* (1992), les flavonoïdes possédant un groupement hydroxyle (OH) sont beaucoup plus actifs que ceux qui n'en possèdent pas [53]. De même, il a été démontré que le pouvoir antimicrobien des flavonoïdes augmente avec leur degré d'hydroxylation; ces mêmes constatations ont été faites pour les composés phénoliques simples [225].

L'action de se combiner avec les protéines membranaires et de former des complexes irréversibles a été aussi attribuée aux tannins [119; 240], cette action antimicrobienne serait probablement liée à leur capacité d'inactiver les enzymes microbiennes et les protéines du transport membranaire des cellules bactériennes...etc, ils forment également des complexes avec les polysaccharides des membranes bactériennes [272].

La présence de ces trois catégories de classes de molécules bioactives (Flavonoïdes, quinones et tannins) dans notre plante, a été déjà démontrée par les screening tests, ceci pourrait expliquer son activité antibactérienne remarquable.

D'autres molécules peuvent être à l'origine de cette activité antibactérienne tel que l' α - pinène, l' α - thujone, l'apigénine, le borneol, l'acide caféique, carvacrol, caryophyllène, la fusetine, Kaempferiol, limonene, linalool, myrcene, p- cymene, pinene, 1-terpinene 4-ol et le thymol (voir tableau 3.30) [185; 45; 58; 140; 116; 155 ; 204; 83 ; 70].

3.5. Résultats des tests des activités biologiques de *Thymus vulgaris L.*

3.5.1. Activité antioxydante

Les résultats rapportés dans la figure 3.47 montrent que plus la concentration de l'extrait méthanolique est élevée, plus l'activité réductrice est meilleure, donc le pouvoir réducteur est proportionnel à la concentration. Nos observations rejoignent celle de ISMAILIA et *al.* (2004) qui a travaillé sur l'extrait méthanolique des feuilles de *Thymus saturoioides L.* du Maroc.

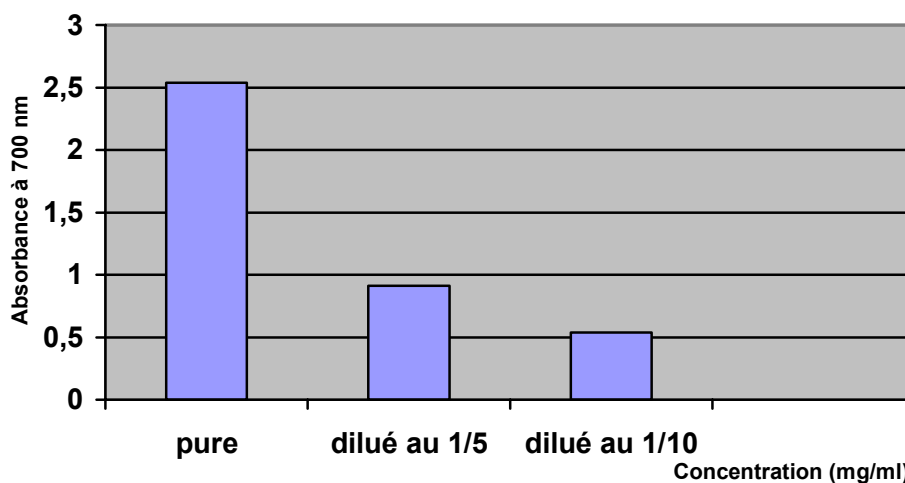


Figure 3.47 : Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques à différentes concentrations.

En ce qui concerne l'activité réductrice de l'extrait méthanolique à une concentration de 0.11 mg/ml, l'absorbance obtenue est de 0.9134 ; cette dernière

est supérieure à celle du témoin négatif (Absorbance égale à 0.08592) et inférieure à celle du contrôle positif qui est un antioxydant de synthèse utilisé en industrie alimentaire pour retarder l'oxydation des lipides, c'est l'Hydroxyanisole butylé (BHA) (Abs égale à 1.568) (Figure 3.48). Cette différence d'absorbance entre l'extrait et le témoin est due à l'activité réductrice des molécules bioactives présentes dans l'extrait de *Thymus vulgaris* L.. Les mêmes résultats ont été obtenus par ISMAILIA et *al.* (2004) avec l'extrait méthanolique de *Thymus saturoioides* L. à la même concentration (0.14 mg/ ml).

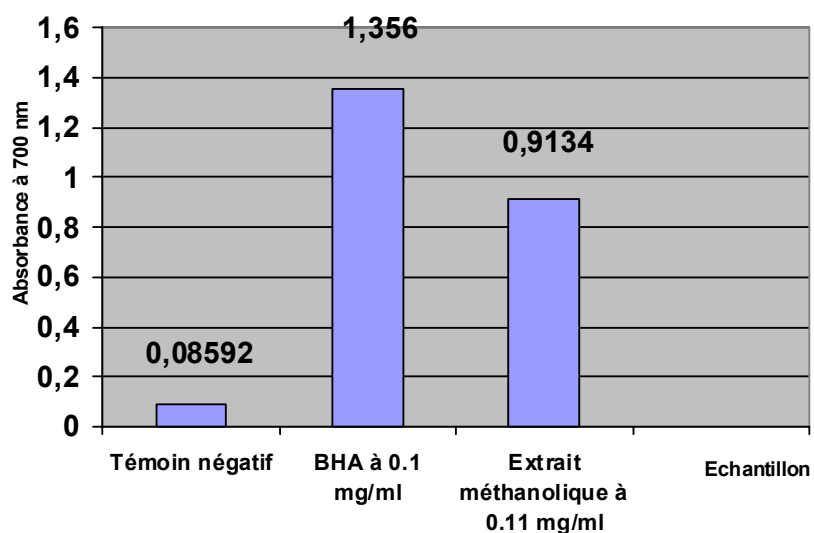


Figure 3.48 : Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* L. et des témoins.

L'activité réductrice des antioxydants de synthèse (figure 3.49) a montré qu'à une concentration de 0.02 mg/ml, l'acide gallique a une activité importante (Absorbance égale à 0.7833) par rapport à l'acide ascorbique (Absorbance égale à 0.5629) et à l'Hydroxyanisole butylé (BHA) (Absorbance égale à 0.2197).

La comparaison des activités réductrices de l'extrait méthanolique à celles des antioxydants de synthèse, a montré que les antioxydants de synthèse ont une activité réductrice importante par rapport à notre échantillon. Les mêmes constatations ont été retrouvées par DORMAN et *al.* (2003) et KANATT et *al.* (2007). Cependant, GULCIN et *al.* (2004) ont constatés que l'activité réductrice

des extraits éthanoliques du clou de girofle et de la lavande a été plus élevée que celle de l'Hydroxyanisol butylé.

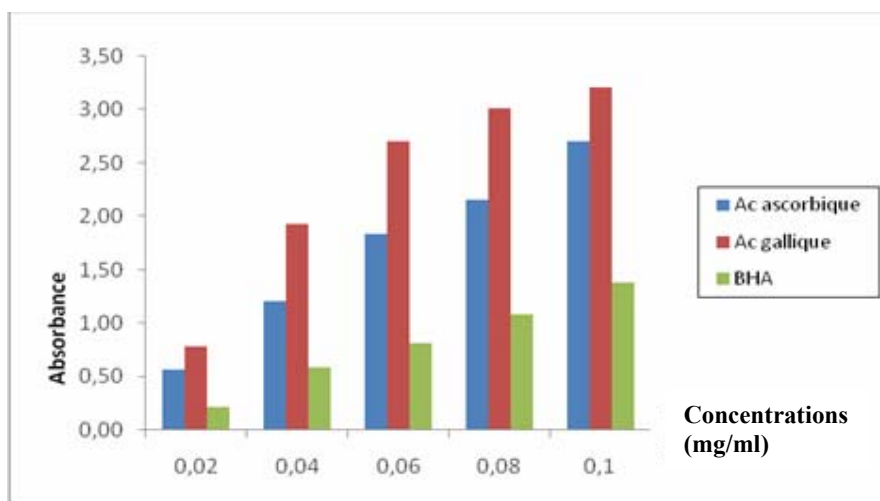


Figure 3.49 : Pouvoir réducteur des antioxydants de synthèse

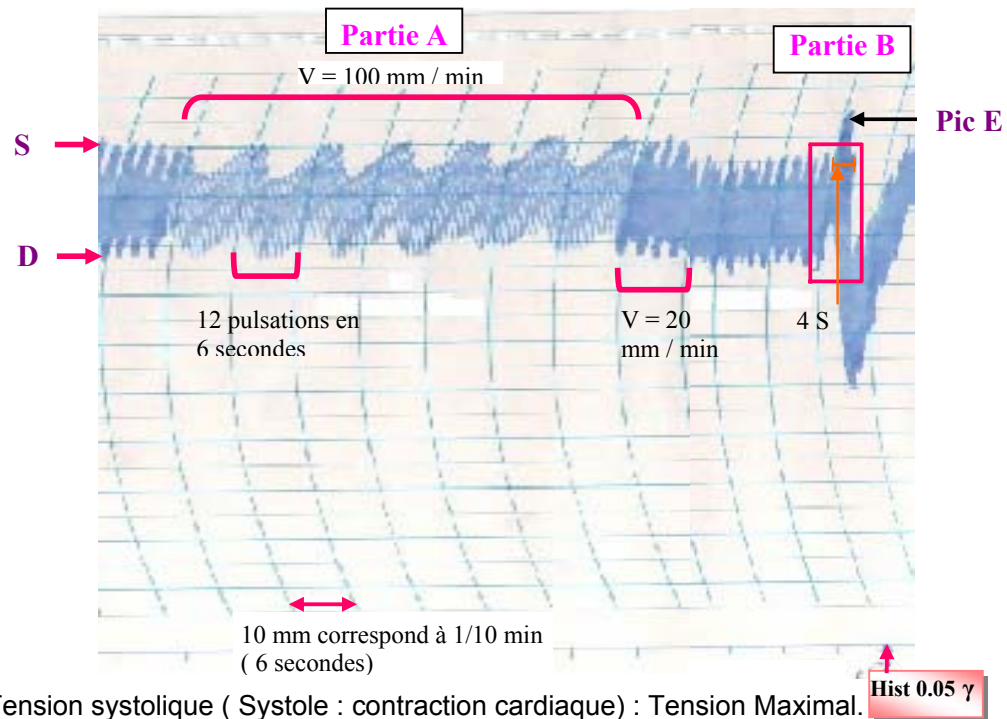
Les études faites sur l'activité antioxydante d'autres espèces de *Thymus* tel que *T. pulegioides L.* de La Lituanie [160] et *T. vulgaris L.* de France [268], ont montré une forte activité réductrice des extraits éthanoliques. Selon ces mêmes auteurs, cette activité est due à la présence des composés phénoliques dans les plantes ; vu l'existence d'une corrélation linéaire entre la proportion des composés phénoliques dans la plante et sa capacité antioxydante [141; 142].

L'activité antioxydante du Thym est due à sa teneur en carvacrol (63.30 % de son Huile essentielle) et en thymol (1.86 % de son HE) et en p-Cymene (31.32 % de son HE) [275; 251], à sa teneur en flavonoïdes (4.356 mg/g de poudre végétale) [279] [94] et en composés phénoliques [160]. La concentration de ces derniers étant en relation directe avec le pouvoir antioxydant de la plante [141].

3.5. 2. Activité hypotensive

La mesure du pouls s'effectue en se référant à la partie A de la figure 3.50. On a pu compter 12 pulsations en 6 secondes, ce qui correspond à 120 pulsations par minute ; valeur du pouls normal chez le chat.

Nous constatons après la première injection d'histamine qu'il s'est écoulé environ 4 secondes entre cette injection et la réponse du chat, c'est le temps de latence (Voir partie B de la figure 3.50).



S : Tension systolique (Systole : contraction cardiaque) : Tension Maximal.

D : Tension diastolique (Diastole : relâchement du cœur) : Tension Minimal.

V : Vitesse de déroulement du papier (millimètre / minute).

Figure 3.50 : Mesure du pouls du chat.

On constate également que la réaction de l'organisme pour rétablir la tension normale peut être brutale au point de provoquer un léger pic hypertensif momentané (Voir pic L de la figure 3.51).

Le pic qui suit immédiatement chaque injection (Voir les pics : E de la figure 3.50 et F, G, H de la figure 3.51) est provoqué par une petite hyper volémie due au volume injecté.

La partie C de la figure 3.51 montre qu'il y a une proportionnalité entre la dose de l'histamine et la chute de tension.

Après repositionnement du bouton de sensibilité à la valeur pour laquelle il a été étalonné, une nouvelle injection d'Histamine à $0,1 \delta$ nous donne une chute de tension de 6 cm sur le graphe, ce qui correspond en réalité à 60 mm Hg.

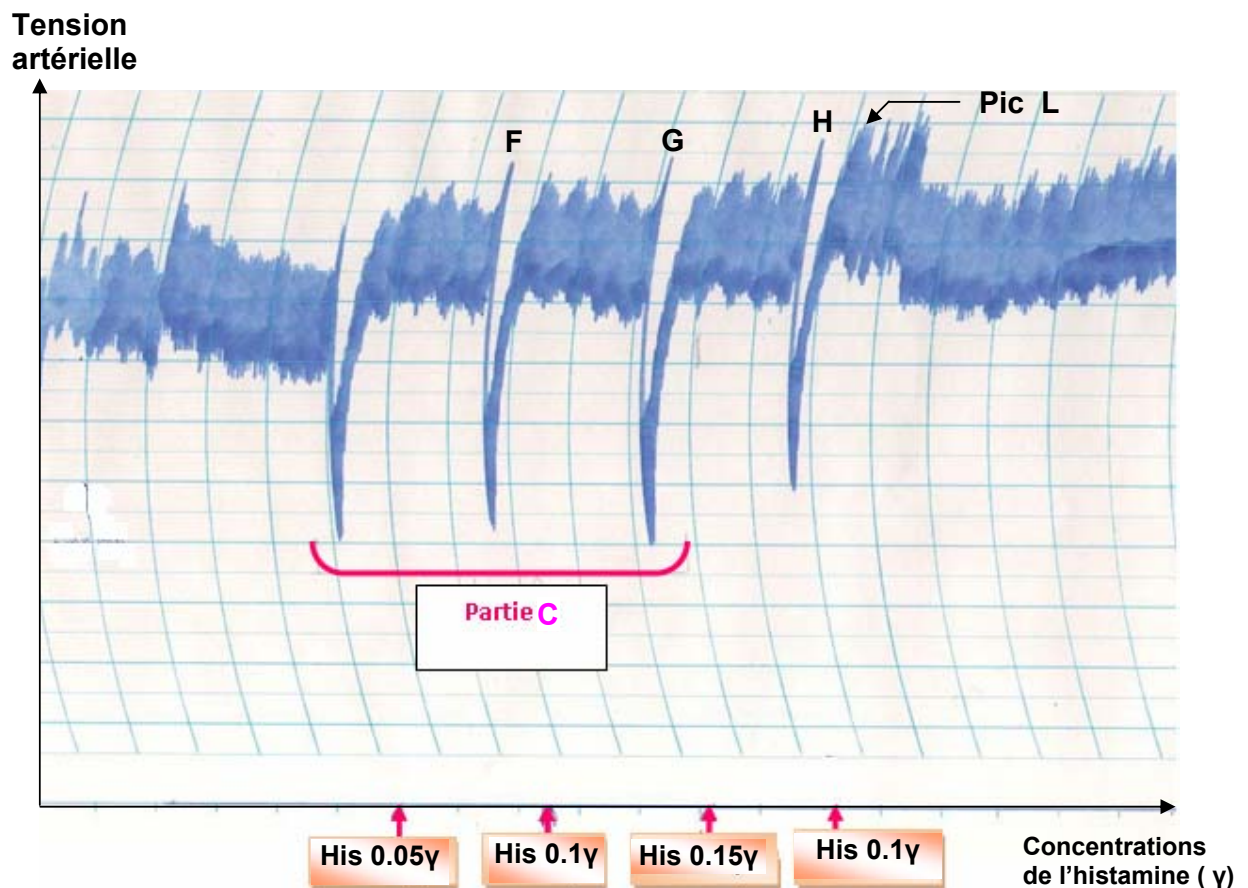


Figure 3.51 : Tests de validation de l'action hypotensive de l'histamine (Tensions artérielles de l'animal en fonction des doses croissantes d'histamine injectées).

L'interprétation de la figure 3.52, correspondant à la réponse de l'animal aux injections des différentes concentrations de l'extrait aqueux, s'effectue en comparant chaque valeur de la chute de tension provoquée par l'histamine à 0.1 γ cinq minutes avant et après l'administration de l'échantillon (Voir tableau 3.25).

Tension artérielle
(mmHg)

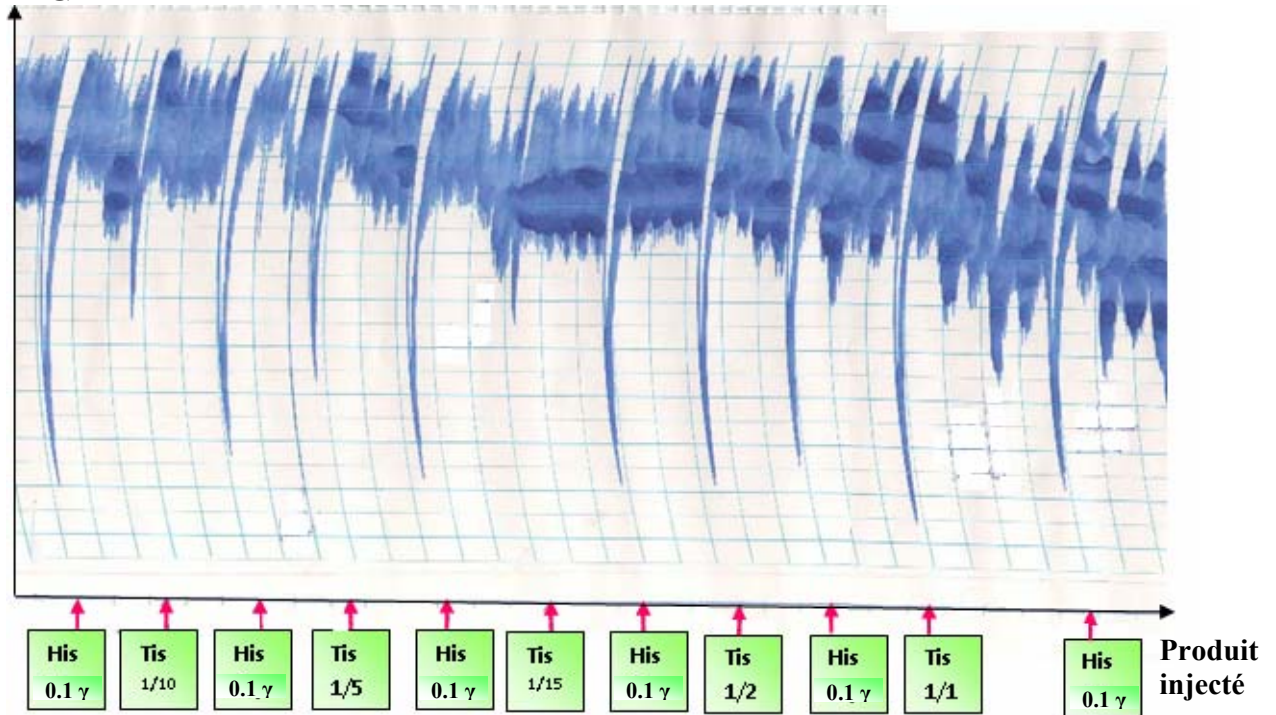


Figure 3.52 : Tensions artérielles relatives aux différentes doses d'extraits aqueux injectées.

Tableau 3.25 : Effet des différentes concentrations de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* L. sur la tension artérielle du Chat (Les injections des extraits aqueux sont intercalées par des injections d'histamine 0.1 γ):

	Concentration des extraits	Facteur de dilution des extraits aqueux	Valeur de la chute de tension en cm	Correspondance en mm Hg
Histamine	0.1 γ	-	6	60
Extrait aqueux	0.66%	1/15	1,75	17,5
Histamine	0.1 γ	-	6	60
Extrait aqueux	1%	1/10	2,5	25
Histamine	0.1 γ	-	6	60
Extrait aqueux	2%	1/5	3,75	37,5
Histamine	0.1 γ	-	6	60
Extrait aqueux	5%	1/2	5,25	52,5
Histamine	0.1 γ	-	4.87	48.7
Extrait aqueux	10 %	1	6	60
Histamine	0.1 γ	-	4.8	48

Pour une lecture plus explicite, les valeurs du tableau 3.30 sont reportées sur la figure 3.53.

On remarque que la réponse du chat à l'histamine a diminué au cours de l'expérimentation, il est devenu moins sensible, ceci serait dû probablement à une accoutumance aux produits, à l'hypervolémie ou autre, donc normalement les valeurs notées pour le thym sont en réalité plus élevées que celles qu'on a enregistré pour les dernières concentrations de l'extrait aqueux (5 % et 10%), parallèlement à celles causées par l'histamine.

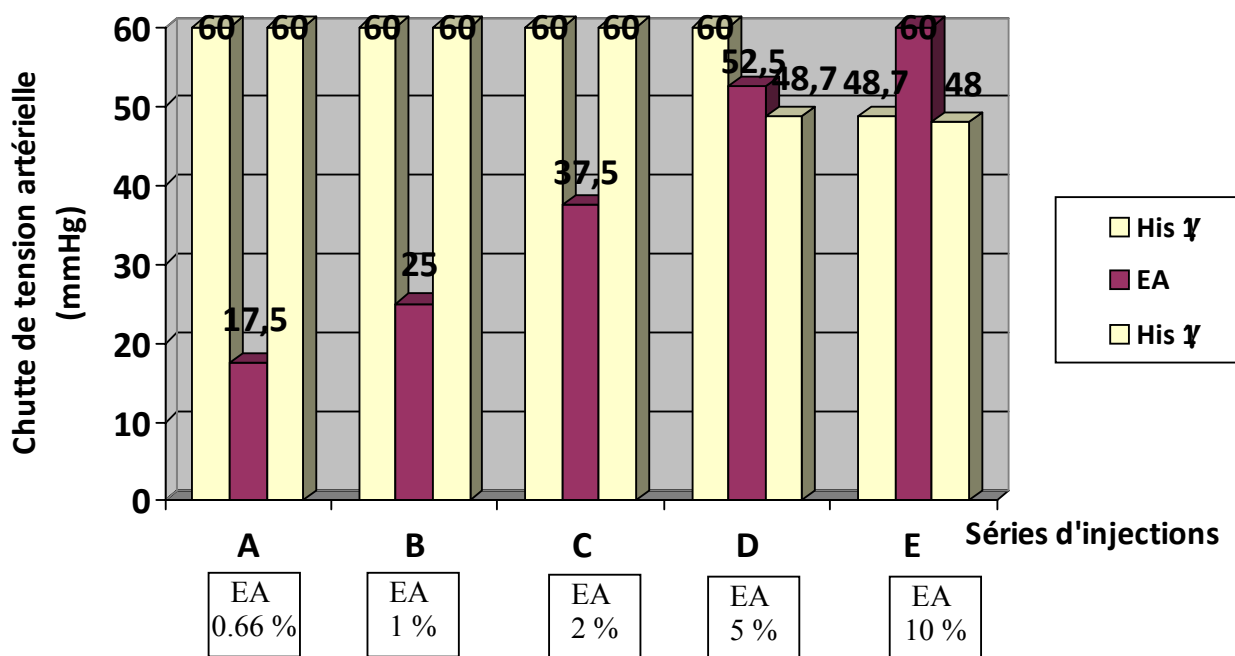


Figure 3.53: Evaluation de l'effet hypotensif (Chute de tension artérielle) de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* L.

En définitive, on peut conclure qu'il y a une relative linéarité de l'effet dose d'extrait aqueux - réponse.

A la fin des essais, nous avons sacrifié le chat par une injection de 0,15 ml d'huile essentielle pure (mort par embolie).

Nous avons mis en évidence par HPLC, de nombreuses substances ayant un effet hypotensif tel que : l'apigénine à une proportion égale à 36.3 mg / 100 g de poudre de Thym et le Kaempferol à une teneur égale à 19.5 mg / 100 g [91; 3].

3.5. 3. Effet antipyrétique

3.5. 3. 1. Essai à blanc

A l'exception des lapins des box n° 8 et 11, qui ont présentés une élévation de température ($\Delta T = 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$), les autres lapins ont présentés des valeurs qui ne dépassent pas les normes fixées par la pharmacopée, donc peuvent être utilisés pour le test proprement dit.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau correspondant à l'essai à blanc (Appendice F).

3.5. 3. 2. Essai proprement dit

Les résultats détaillés de chaque essai (lot) figurent dans les appendices de la thèse.

Les résultats globaux sont représentés dans le tableau et le graphe suivant : (Tableau 3.26) (Figure 3.54)

Tableau 3.26: Résultats des températures des lapins en fonction du produit administré.

Lot	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Somme des variations de température ($^\circ\text{C}$).	3.1	0.4	0.9	4.3	4.4	2.8	3.5	3.8	2.9

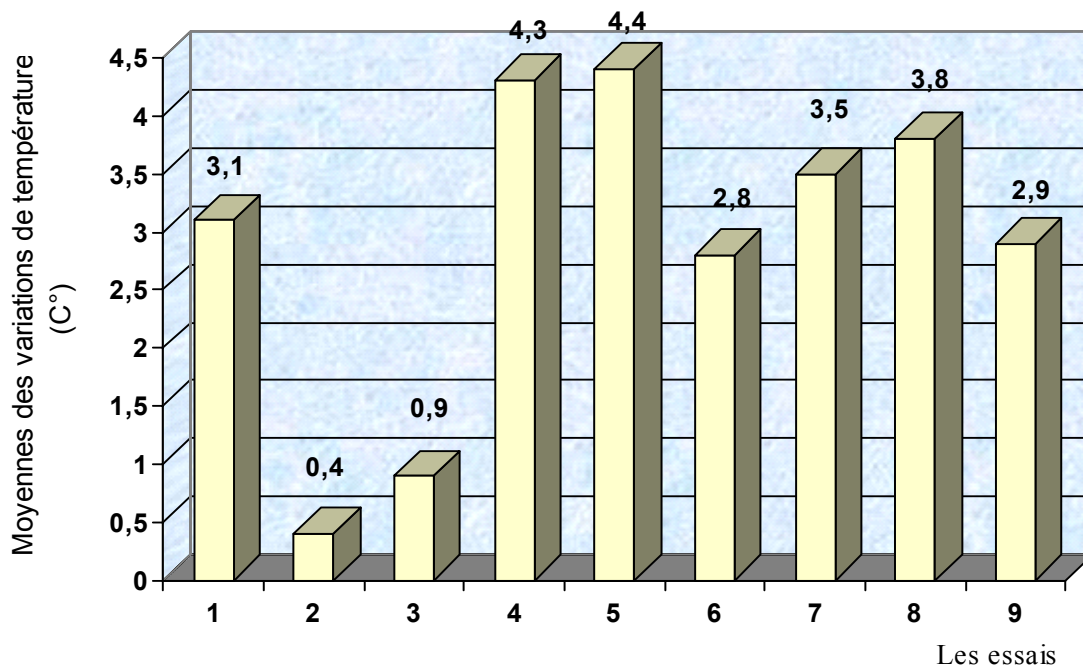


Figure 3.54 : Variation de la température en fonction du produit administré.

Nous n'avons pas constaté d'effet antipyrétique, mais plutôt un effet pyrétogène. Ceci est probablement dû à :

- Soit les échantillons sont contaminés par des endotoxines.
- Soit qu'ils sont pyrétogènes.
- Ou, les deux raisons associées.

Pour lever le doute sur la contamination endotoxinique, le test LAL de recherche des endotoxines bactériennes a été réalisé sur les deux extraits végétaux (Extrait aqueux, Huile essentielle) (Voir la description du test LAL).

Les résultats de ce dernier essai n'ont pas permis d'élucider ce problème suite à la présence dans l'échantillon d'inhibiteurs de la réaction LAL- endotoxine. Cet inhibiteur n'a aucun impact sur le site pyrogène de la molécule d'endotoxine.

Par expérience, il a été constaté une certaine proportionnalité entre les concentrations d'endotoxine injectée aux lapins et les élévations de température correspondantes [107].

Dans notre expérimentation, les deux concentrations simple et double d'extrait aqueux, donc simplement et doublement contaminés éventuellement par l'endotoxine, ont donnés pour chaque lapin des élévations de température

moyenne très voisines. Ces résultats infirment l'hypothèse de la contamination endotoxinique.

On conclue donc que l'effet pyrogène est dû aux échantillons eux même.

3.5.3.3. Analyse de la variance

L'analyse de variance est réalisée en considérant deux facteurs :

- Facteur 1 : Produit-Dose avec 9 niveaux (EAD1-Endotoxine (EE1), EAD2-Endotoxine (EE2), EAD1 (EA1), EAD2 (EA2), HED1-Endotoxine (HEE), HED1 (HE), Perfalgan-Endotoxine (PE), Eau Physiologique (EP), Endotoxine (END)).
- Facteur 3 : Blocs avec 3 niveaux (Blocs 1 (B1), Blocs 2 (B2), Blocs 3 (B3)).

Les variables étudiées sont : La température initiale (TI) et la variation de la température (VT).

Cette analyse a révélée pour la première variable (tableau 3.27) une différence non significative pour les deux facteurs considérés (Produit-dose ($P = 0.0606$) et blocs ($P = 0.2175$)), donc, tous les lapins utilisés présentent des TI (avant injection des produits) semblables.

Tableau 3.27 : Analyse de variances de la première variable (Température initiale)

	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Probabilité	E.T	C.V	Signification
VAR . TOTAL	2.31	26	0.09					
VAR . FACTEUR	1.16	8	0.15	2.45	0.0606			DNS
VAR . BLOCS	0.20	2	0.10	1.68	0.2175			DNS
VAR . RESIDUELLE	0.95	16	0.06			0.24	0.6 %	

DNS : Différence non significative. S.C.E : La somme des carrés des écarts.

C.V : Le coefficient de variabilité. E.T : Ecart type.

ddl : Le degré de liberté.

Nous constatons suite à l'analyse du tableau 3.28 correspondant à la deuxième variable (VT) qu'il existe une différence significative pour le premier facteur (Produit-dose) avec $P = 0.0257$ et une différence non significative pour le

facteur Blocs ($P = 0.805$), donc les variations des températures de chaque lot est différente des autres lots qui ont reçu un traitement différent ; cependant elle reste toujours semblable lorsqu'il s'agit des lapins du même lot.

Tableau 3.28 : Analyse de variances de la deuxième variable (Variations de la température)

	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Probabilité	E.T	C.V	Signification
VAR . TOTAL	9.56	26	0.37					
VAR . FACTEUR	5.75	8	0.72	3.11	0.0257			DS
VAR . BLOCS	0.10	2	0.05	0.22	0.8050			DNS
VAR . RESIDUELLE	3.70	16	0.23			0.48	49.0 %	

DS : Différence significative.

DNS : Différence non significative.

3.5.3.4. Test de NEWMAN et KEULS

Pour déterminer les groupes homogènes, on a utilisé le test de NEWMAN et KEULS au seuil 5% (Tableau 3.29).

Deux groupes homogènes sont identifiés (A et B), le groupe A intéresse le lot EAD1-Endotoxine où la variation de la température est élevée, et les autres lots (EE2, EA1, END, EA2, HEE, HE, EP) qui présentent une élévation de température mais qui reste faible, raison pour laquelle ils chevauchent avec le deuxième groupe (B), ce dernier est représenté également par le témoins positif (PE) où on note une baisse de température grâce à l'effet antipyrétique de perfalgan.

Tableau 3.29 : Résultat du test de NEWMAN et KEULS (activité antipyrétique)

F1	Libelles	Moyennes \pm écart type	Groupes homogènes
1	EE1	1.57 \pm 0.40	A
2	EE2	1.43 \pm 0.51	A B
5	EA1	1.27 \pm 0.33	A B
8	END	1.20 \pm 0.24	A B
6	EA2	1.17 \pm 0.67	A B
3	HEE	0.93 \pm 0.65	A B
9	HE	0.83 \pm 0.60	A B
7	EP	0.30 \pm 0.08	A B
4	PE	0.13 \pm 0.16	B

3.5. 4. Le test LAL

La pharmacopée européenne 2007, a fixée une limite en endotoxine inférieure à 0.250 EU / ml. Notre réactif LAL a une sensibilité confirmée de $\lambda = 0.125$ EU/ ml, donc, cet échantillon d'endotoxine est valable pour être utilisé dans le LAL test.

Nous avons démontré également par le témoin négatif (Réactif LAL + Eau apyrogène) que la verrerie n'est pas contaminée par l'endotoxine, et grâce au témoin positif (Réactif LAL + Endotoxine) que le réactif du LAL est sensible puisque la réaction de gélification s'est produite en présence d'endotoxine.

D'autre part, nous avons obtenu un résultat négatif (Absence de gélification des solutions) avec l'extrait aqueux et de l'isolat aqueux de l'HE testées par le réactif LAL. Ce résultat peut s'interpréter de deux manières : soit les échantillons sont apyrogènes, ou alors les solutions contiennent des substances inhibitrices de la réaction LAL.

Cette dernière hypothèse peut être vérifiée par le test d'inhibition décrit par les fiches techniques du LAL up-Date. En effet, nous avons constaté que l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* L. a bien inhibé la réaction de gélification indicatrice de la présence d'endotoxines.

Ce résultat ne permet pas donc d'élucider ou d'interpréter les résultats obtenu dans les expérimentations in vivo.

3.5. 5. Effet Anti- inflammatoire des extraits végétaux

3.5. 5. 1. Effet phlogogène de la carraghénine

Le lot ayant reçu une injection de carraghénine en sous plantaire sans avoir reçu de traitement préalable (Lot n° 9) a montré une évolution continue et presque linéaire du pourcentage moyen de l'œdème en fonction du temps.

La carraghénine est donc un produit pro inflammatoire, d'autant plus que le lot témoin qui a reçu de l'eau physiologique (Lot n° 8) n'a donné aucune évolution de l'œdème (il s'agit du témoin négatif de l'effet phlogogène de la carraghénine) (Tableaux 3.30 et 3.31, figure 3.55).

3.5. 5. 2. Effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle

Par voie orale, l'HE a provoquée une baisse sensible du pourcentage moyen de l'œdème des pattes, surtout à la forte dose (Lot n° 2), l'œdème a complètement disparus au bout de 120 minutes. Cette forte dose s'est avérée plus efficace que le diclofenac sodique (Lot n° 11).

Le lot ayant reçu une application locale de la plus faible dilution de l'HE (Lot n° 3) a réagit plus rapidement et de façon plus importante au traitement par rapport à ceux ayant reçu le traitement par voie orale. Ceci est dû probablement à la rapidité et la facilité de diffusion des HE à travers la peau grâce à leur composition de nature lipidique et à leurs composants de très faible poids moléculaire ainsi qu'à la nature lipidique de la peau [144].

L'évolution de l'inflammation chez les rats ayant reçu comme traitement l'huile de tournesol (Lot n° 10) est semblables à celle des rats qui ont reçu de la carraghénine sans avoir de traitement contre l'inflammation (Lot n° 9). Ces résultats montrent que la réduction de l'inflammation est due à l'action de l'HE et non pas au solvant dans lequel l'huile est diluée (Tableaux 3.30 et 3.31, figure 3.56).

3.5. 5. 3. Effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux

Les lots 4 et 5 qui ont reçu par voie orale les doses de 0.075 g/ml et 0.15 g/ml, ont réagi globalement d'une manière semblable à ceux ayant été traités par l'anti-inflammatoire (Diclofenac).

L'effet le plus rapide et le plus intense a été observé chez le lot n° 6 (0.22 g/ml) comparé au lot traité par le diclofenac.

L'effet anti-inflammatoire ne s'est manifesté qu'après 150 minutes et de façon modérée pour le lot n° 7 (Injection en sous plantaire de l'extrait aqueux à la plus faible dose) (Tableaux 3.30 et 3.31, figure 3.57).

La comparaison des lots ayant reçu les différentes doses de l'HE et ceux de l'EA a montré que l'effet anti-inflammatoire est plus important pour l'extrait aqueux à partir de 0.15 g/ml mais il est moins rapide que celui de l'HE (figure 3.58).

Tableau 3.30 : Evolution du pourcentage moyen de l'œdème des pattes (Pourcentage de l'inflammation) :

Temps (min) Lot	30	60	90	120	150	180	210
1	18.98	13.5	10.95	8.61	7.34	5.67	5.08
2	22.96	10.62	3.22	0	0	0	0
3	15.64	2.86	0.76	0.095	0.0019	0	0
4	36.18	35.76	34.68	31.69	23.55	18.20	13.49
5	18.51	16.76	11.11	8.18	6.04	5.26	4.09
6	28.09	15.28	11.36	3.51	0	0	0
7	35.68	35.68	35.88	41.37	46.66	38.82	36.66
8	7.4	1.64	0	0	0	0	0
9	14.46	17.14	19.62	21.48	23.96	27.27	27.68
10	7.21	9.35	21.24	23.19	24.17	25.34	26.12
11	13.48	10.11	11.04	5.24	3.55	2.24	1.12

$$PO = \frac{E_f - E_{i1}}{E_{i1}} \times 100$$

P0 : Pourcentage de l'œdème des pattes.

E_f : Epaisseur finale de la patte (mesurée chaque demi heure).

E_{i1} : Epaisseur initiale de la patte avant injection de la carraghénine ou de l'eau physiologique.

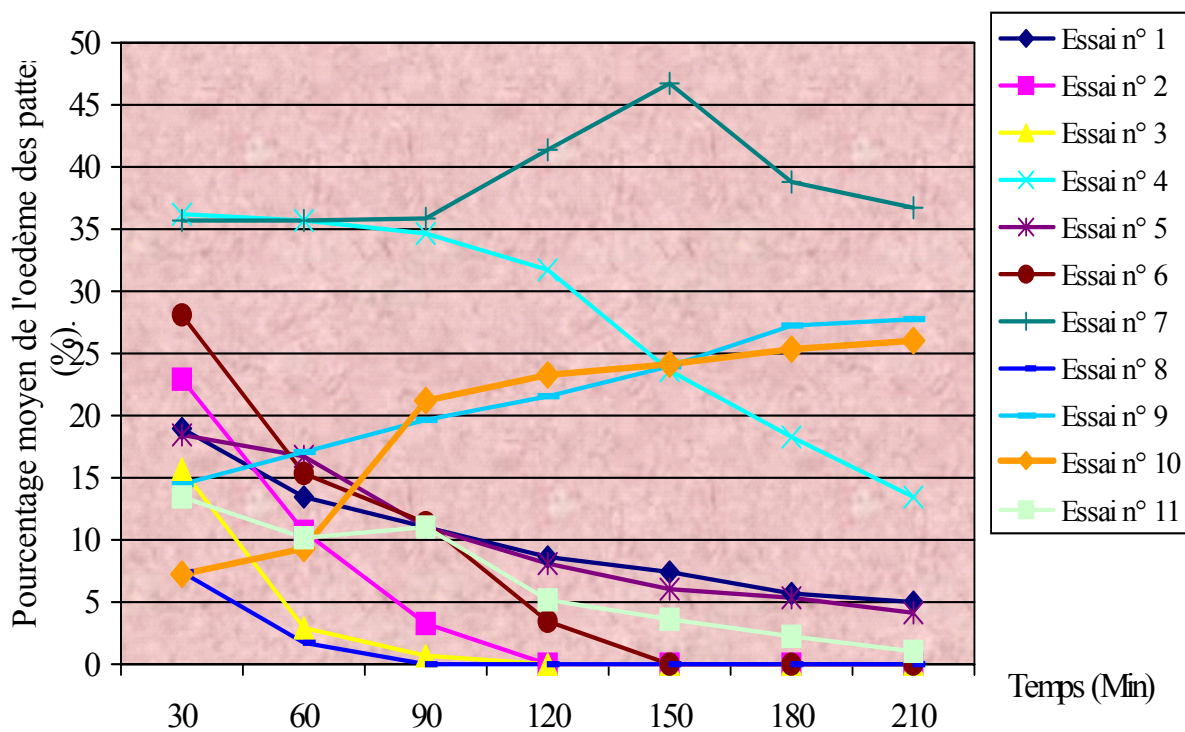


Figure 3.55: Evolution du pourcentage de l'œdème des pattes (pourcentage de l'inflammation) en fonction du temps et du traitement.

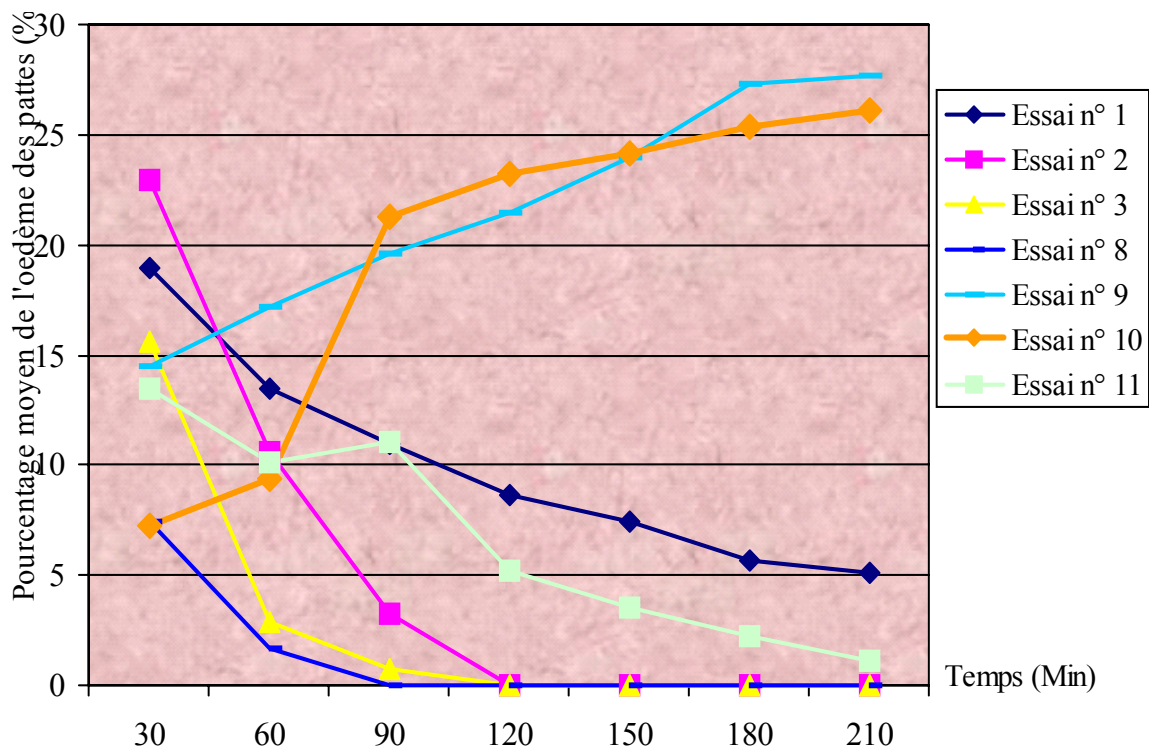


Figure 3.56: Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. sur l'évolution du pourcentage de l'œdème des pattes (pourcentage de l'inflammation) en fonction du temps.

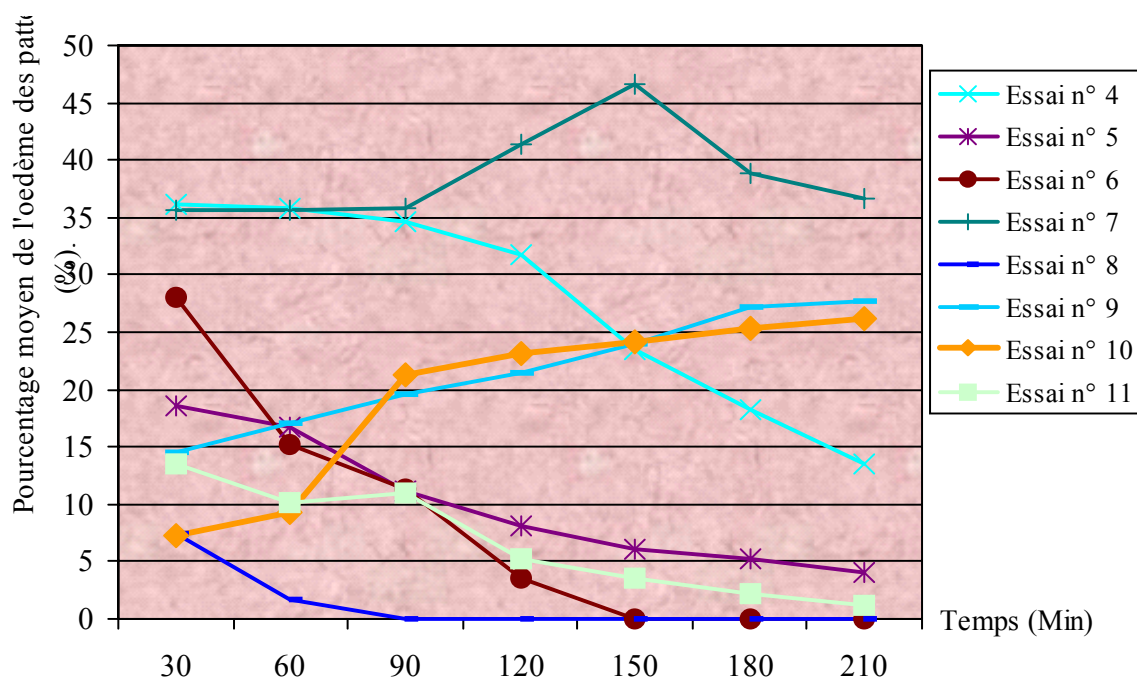


Figure 3.57 : Effet de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris L.* sur l'évolution du pourcentage de l'œdème des pattes (pourcentage de l'inflammation) en fonction du temps.

Tableau 3.31 : Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris L.*

Essais		Epaisseur moyenne de l'œdème (mm)	Pourcentage moyen de l'œdème (%)	Pourcentage moyen de réduction de l'œdème (%)	
HE	Dose 1 : 0.44%	0.26	5.08	85.05	
	Dose 2 : 4.4%	0	0	100	
	Dose 1 appliquée localement	0	0	100	
Extrait aqueux	Dose 1 : 0.075 g/ml	0.63	13.49	66.66	
	Dose 2 : 0.15 g/ml	0.21	4.09	88.06	
	Dose 3 : 0.22 g/ml	0	0	100	
	Dose 1 injectée localement	1.87	36.66	5.55	
Témoins	Eau physiologique (Voie orale)	Injection d'eau physiologique en S.P.	0	0	Pas d'œdème
		Injection de carraghénine en S.P.	1.34	27.68	31.63
	Huile de tournesol		1.34	26.12	25.55
	Diclofenac		0.06	1.12	96.22

S.P : Sous plantaire.

$$PRO = \frac{E_{i1} - E_f}{E_{i2} - E_{i1}} \times 100$$

PRO : Pourcentage de réduction de l'œdème.

E_f : Epaisseur finale de la patte (mesure chaque demi heure).

E_{i2} : Epaisseur initiale de la patte après injection de la carraghénine ou l'eau physiologique.

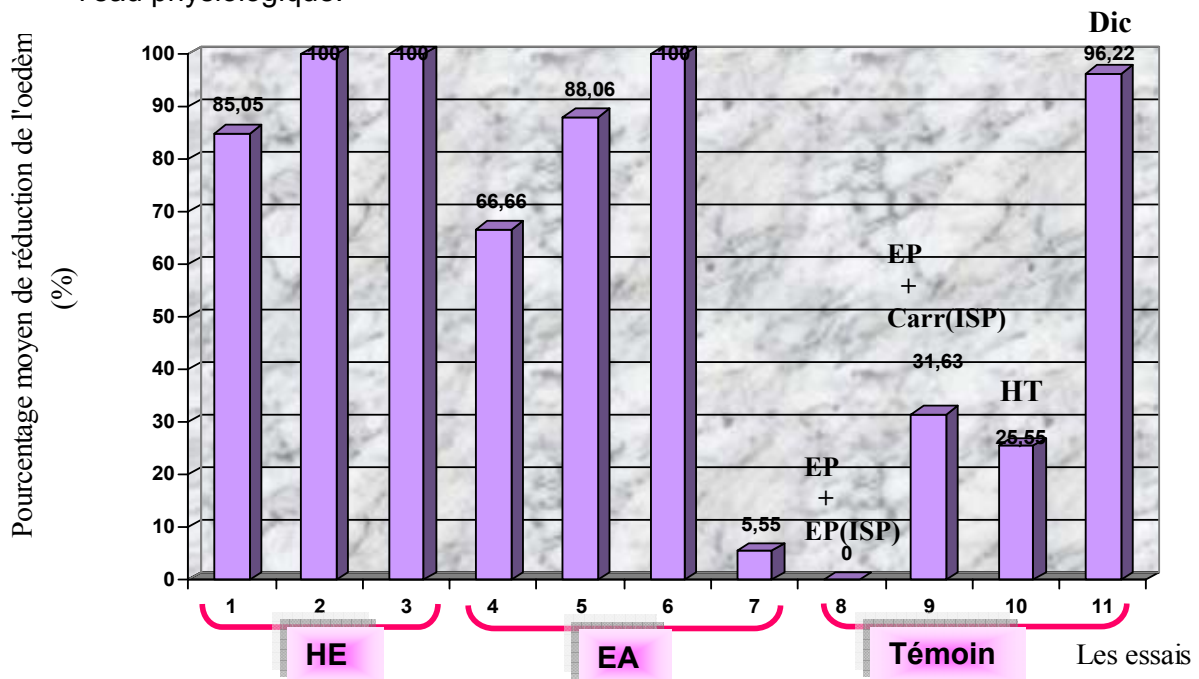


Figure 3.58 : Evaluation de l'effet antiinflammatoire (réduction de l'œdème) des extraits végétaux (EA et HE) de *Thymus vulgaris* L.

L'effet de l'huile essentielle du Thym (*Thymus aetheroleum* L.) contre les processus inflammatoire a été déjà démontré par JUHAS et al. (2008), l'inflammation a été induite par trois méthodes utilisant des inducteurs chimiques de l'inflammation qui sont différents (test à la carraghénine, test à l'oxazolone, et le test à l'acide 2,4,6 trinitrobenzenesulphonique (TNBS). Ce test TNBS a été également réalisé par BUKOVSK et al. (2007), qui ont démontré l'efficacité de l'huile essentielle du Thym, utilisée seule ou en combinaison avec celle de l'origan, contre les inflammations de l'intestin induite par le TNBS.

Selon CHAN et al. (2005), l'effet modulateur de l'HE sur la réaction immunitaire provoquée par la carraghénine et l'oxazolone dépend de la concentration de l'huile. Ces observations pourraient être corrélées avec l'effet immunomodulateur du carvacrol, substance majoritaire de la composition de l'HE

de Thym qui active sélectivement la réponse extracellulaire des Kinases (Extracellularly- Responsive Kinase (ERK)) dans les cellules T de l'immunité [54].

D'autres études ont révélé que l'extrait de Thym peut augmenter le nombre des polynucléaires, des lymphocytes totaux, des lymphocytes T CD4 +, des lymphocytes T CD8 + et des cellules tueuses T (Natural Killars : NK) [88].

L'effet anti-inflammatoire de l'HE de Thym pourrait être également dû à sa capacité de moduler l'activation des polynucléaires neutrophiles [2]. En plus, l'effet antioxydant de l'HE de Thym et son effet inhibiteur de la peroxydation des lipides peuvent diminuer l'ampleur de la réaction inflammatoire induite par la carraghénine [35].

L'étude de l'activité anti-inflammatoire d'une autre espèce de Thym (*T. satureioides L.*) réalisée par ISMAILIA et *al.* (2004) a montré un effet réducteur de l'oedème provoqué par l'huile de croton ; celle ci est évaluée à 24 % pour l'extrait hexanique et à 65 % pour l'extrait chloroformique et à 29 % pour l'extrait chloroforme/méthanolique. Les résultats que nous avons obtenu avec notre plante ont montré que ces effets sont plus importants que ceux de *T. satureioides L.*. A cet effet nous avons réduit à 100 % l'oedème des pattes avec les deux extraits végétaux (HE et extrait aqueux).

Selon SALVADOR et CHISVERT (2007), les flavonoïdes seront à l'origine de l'effet anti-inflammatoire, et d'après l'étude phytochimique, les extraits végétaux (EA et HE) contiennent une proportion qui n'est pas négligeable de flavonoïdes.

L'huile essentielle de Thym semble inhiber la synthèse des prostaglandines (médiateurs de l'inflammation) [260], cette activité est principalement attribuée au thymol.

L'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux est attribué à sa teneur en composants capables de réduire les processus de l'inflammation tel que l'apigénine [204], le kaempferol [166], et l'acide cafeique [134].

3.5.5.4. Analyse de la variance

Les facteurs à considérer sont les suivants :

- Facteur 1 : Produit-dose-mode d'administration (PDMA) avec 11 niveaux (HED1 orale(HE1), HED2 orale(HE2), HED1 locale(HE3),

EAD1 orale(EA1), EAD2 orale(EA2), EAD3 orale(EA3), EAD1 injectable(EA4), EPD0 orale-injectable(EP0), EPD0 orale (EPR), HT orale (HT0), Diclofenac D0 orale (DIC).

- Facteur 2 : Temps avec 7 niveaux (T30 (30 min), T60 (60 min), T90 (90 min), T120 (120 min), T150 (150 min), T180 (180 min), T210 (210 min)).
- Facteur 3 : Blocs avec 4 niveaux (Blocs 1 (B1), Blocs 2 (B2), Blocs 3 (B3), Blocs 4 (B4)).

La variable à étudier concerne le pourcentage de l'œdème (PE).

Cette analyse montre une différence très hautement significative pour les deux facteurs (Temps et PDMA), ce qui implique qu'ils ont une grande influence sur le pourcentage de l'œdème. La probabilité chez le facteur blocs est de 0.1578, ce qui est supérieur à 0.05, cela signifie que la différence entre les blocs concernant cette variable (PE) n'est pas significative, donc tous les rats du même lot répondent au traitement de la même manière, ce qui confirme l'homogénéité de tous les lots (Tableau 3.32).

Tableau 3. 32 : Analyse de variances (Activité anti-inflammatoire des extraits végétaux)

	S .C .E	ddl	Carrés moyens	Test F	Probabilité	E .T	C.V	Signification
Var . Totale	60949.27	307	198.53					
Var . Facteur 1	40473.66	10	4047.37	93.89	0.0000			DTHS
Var . Facteur 2	3290.43	6	548.40	12.72	0.0000			DTHS
Var . inter F 1 . 2	7131.71	60		2.76	0.0000			DTHS
Var . Blocs	225.04	3	75.01	1.74	0.1578			DNS
Var . Résiduelle 1	9828.44	228	43.11			6.57	46.2%	

S.C.E : La somme des carrés des écarts.

DTHS : Différence très hautement significative.

ddl : Le degré de liberté.

DNS : Différence non significative.

C.V : Le coefficient de variabilité.

E.T : Ecart type.

3.5.5.5. Test de NEWMAN et KEULS

Ce test permet de constituer des groupes homogènes de traitement, ainsi les moyennes appartenant au même groupe sont considérées comme non différentes.

Les tableaux 3.33 et 3.34 présentent les classements de moyennes pour ce type de traitement à travers le test de Newman et Keuls avec un intervalle de confiance de 95 %.

Le tableau 3.38 montre qu'il y a cinq groupes homogènes (A, B, C, D et E), le groupe A représente le lot ayant reçu comme traitement l'EA-carraghenine en injection sous plantaire, ce qui a provoqué une inflammation in-situ au lieu de réduire l'œdème. Le groupe B est représenté par la plus faible dose de l'EA (EA1), qui n'a réduit qu'un faible pourcentage de l'œdème, contrairement aux autres doses (EA2, EA3) qui constituent un même groupe homogène (groupe D) avec les doses 1 et 2 de l'HE et le témoin positif (DIC) ; ces derniers traitements ont réduit l'œdème des pattes mais d'une façon moins rapide que l'HE.

Le groupe C représente les témoins négatifs (HT0, EPR) pour lesquels aucun effet anti-inflammatoire n'a été observé.

Tableau 3. 33 : Résultat du test de NEWMAN et KEULS pour le facteur 1 (PDMA)

F1	Libelles	Moyennes ± écart type	Groupes homogènes
7	EA4	38.62 ± 7.89	A
4	EA1	28.85 ± 10.61	B
10	HT0	22.74 ± 3.59	C
9	EPR	21.69 ± 6.06	C
5	EA2	10.22 ± 4.86	D
1	HE1	10.08 ± 3.68	D
6	EA3	8.60 ± 6.72	D
11	DIC	5.82 ± 2.62	D E
2	HE2	5.37 ± 6.26	D E
3	HE3	2.92 ± 1.98	E
8	EP0	1.32 ± 2.69	E

L'effet le plus prononcé et le plus rapide a été noté pour l'HE appliquée localement (HE3), HE2 et HE1(Orale), et pour le Diclofenac, ces lots constituent un groupe homogène (groupe E) avec le témoin négatif, chez lequel l'inflammation n'est pas provoquée (Injection d'eau physiologique à la place de la carraghénine).

Pour le facteur 2 « Temps », le test révèle trois groupes homogènes et indépendants (A, B et C) (tableau 3.39), dont le groupe A est représenté par les 30 premières minutes après l'administration des produits, où la plus part des œdèmes persistent, car n'ont pas eu suffisamment de temps pour être réduits. A partir de la 60^{ème} minute, les traitements commencent à faire de l'effet, ce qui représente le groupe B, Ce dernier chevauche avec le groupe C qui présente une réduction (ou augmentation) apparente de l'œdème des pattes comparé à l'état initial.

Tableau 3.34 : Résultat du test de NEWMAN et KEULS pour le facteur 2 (Temps)

F2	Libelles	Moyennes ± écart type	Groupes homogènes
1	30	20.86 ± 8.15	A
2	60	16.60 ± 7.72	B
3	90	14.21 ± 6.49	B C
4	120	13.23 ± 4.89	C
5	150	12.39 ± 3.89	C
6	180	11.71 ± 3.74	C
7	210	10.42 ± 2.72	C

3.5.5.6. Matrice de corrélation

Les tableaux 3.35 et 3.36 révèlent qu'il ya une corrélation négative entre les deux facteurs et le pourcentage de l'œdème, elle est de – 0.668 pour le facteur dose de l'extrait aqueux et de – 0.616 pour le facteur temps (Tableau 3.35), concernant le facteur dose de l'huile essentielle avec le facteur temps, la corrélation

est de -0.377 et -0.649 respectivement (Tableau 3.36). Cela nous permet d'établir des droites de régression pour chaque extrait (Figures 3.59 et 3.60).

Tableau 3. 35 : Matrice de corrélations partielles (Activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux)

	PDMA	TEMPS	PO
PDMA	****		
TEMPS	- 0.411	****	
PO	- 0.668	- 0.616	****

Tableau 3. 36 : Matrice de corrélations partielles (Activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle)

	DOSE	TEMPS	PO
DOSE	****		
TEMPS	- 0.272	****	
PO	- 0.377	- 0.649	****

Selon les figures 3.59 et 3.60, on remarque qu'il existe une très bonne corrélation entre l'évolution de l'œdème et le temps, et ce, à n'importe quelle concentration de l'extrait végétale (HE et EA), les coefficients de corrélation étant respectivement de 0.693 et 0.837 . Les pentes des droites sont négatives, cela veut dire que l'œdème diminue au cours du temps, donc l'EA et l'HE sont efficaces contre l'inflammation.

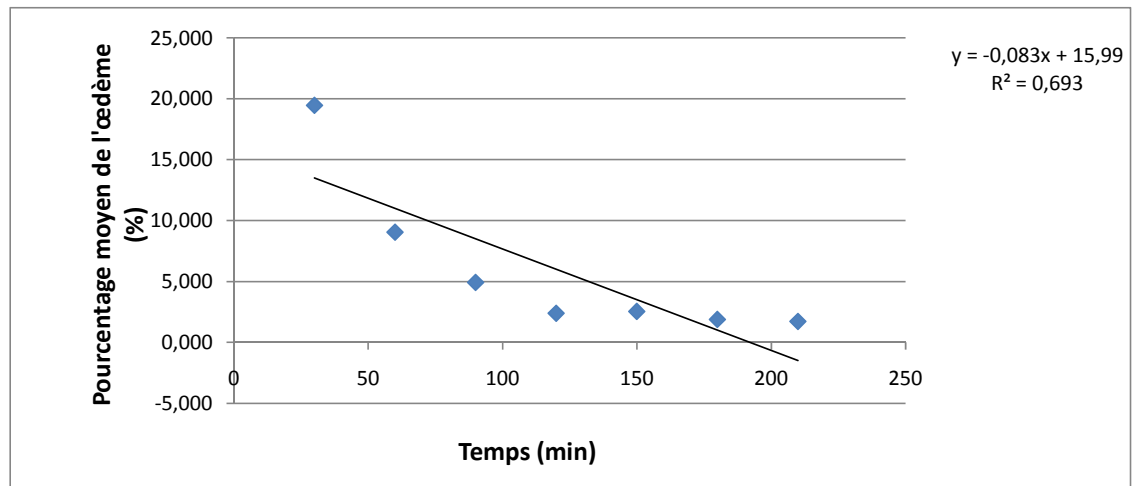


Figure 3.59 : Droite de régression correspondant à la corrélation entre le pourcentage de l'œdème et le temps (Huile essentielle).

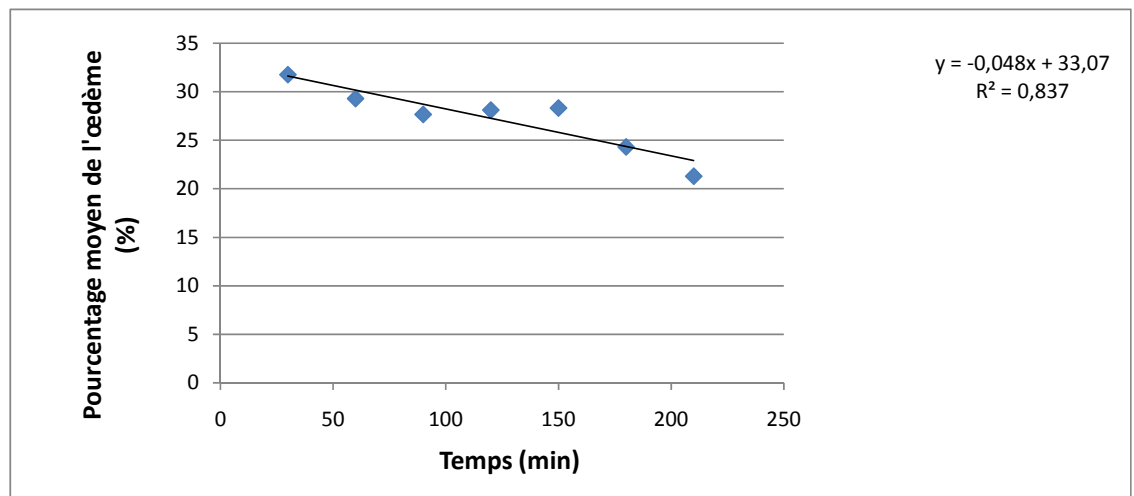


Figure 3.60 : Droite de régression représentant la corrélation entre le pourcentage de l'œdème et le temps (Extrait aqueux).

3.5. 6. Effet antispasmodique

Les résultats obtenus sont consignés dans la figure 3.61. Ils indiquent que l'utilisation de l'huile de tournesol et de la solution physiologique ne donne aucun effet antispasmodique (essai 1 et 2).

D'autres part, l'huile de tournesol et l'huile essentielle de *T. vulgaris L.* n'ont pas provoqué de spasmes en l'absence d'acide acétique (essai 3 et 4).

Ces premiers essais ont été réalisés pour confirmer que les solvants utilisés n'ont aucune influence sur les effets spasmodiques et antispasmodiques.

Un antispasmodique officinal (Spasfon en solution injectable) servira de référence pour évaluer l'intensité de l'effet recherché des deux extraits (Essai 5).

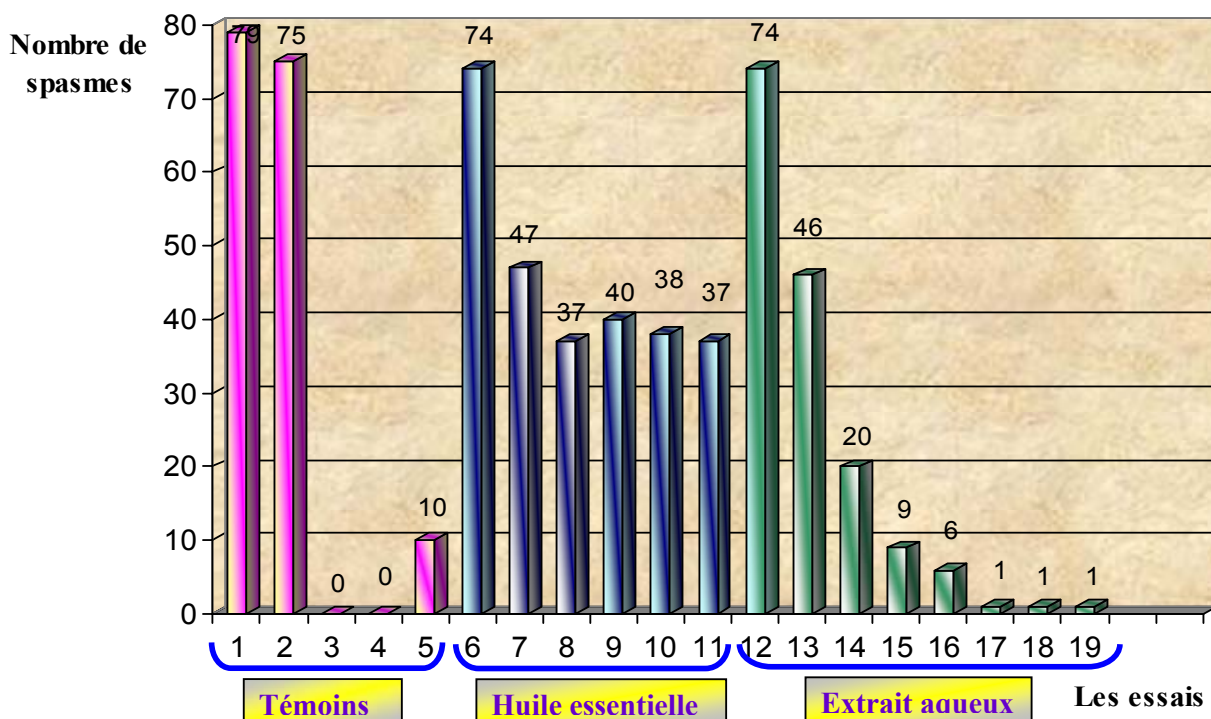


Figure 3.61 : Effet réducteur de spasmes des extraits végétaux (Huile essentielle et extrait aqueux) de *Thymus vulgaris L.*

3.5.6.1. Activité antispasmodique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris L.* (Essais 6-13)

La plus faible dose (0,0002 %) n'a pratiquement pas donné d'effet comparée aux témoins (essai 6), Cependant, lorsqu'on augmente la dose (trois fois plus concentrée), on réduit approximativement de 1/3 le nombre de spasmes (essai 7).

La similitude des résultats des essais 8 à 11 signifie que le maximum d'effet pour l'huile essentielle est atteint à partir de la concentration 0,002 % et jusqu'à 100 fois plus (0.2 %).

La manière avec laquelle évolue cet effet en fonction de la dose rappelle l'allure de la courbe de la cinétique enzymatique. Selon JEFFERY et *al.* (1983), certains composés de *Thymus vulgaris L.* tel que le méthoxy-cirsilineol agissent sur l'activité de certains enzymes ayant un effet sur les médiateurs chimiques synaptiques du système nerveux végétatif de l'intestin.

3.5.6.2. Activité antispasmodique de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris L.* (Essais 14 - 21)

La plus faible dose de l'extrait aqueux (0.1125×10^{-3} g/ml) n'a pas donné d'effet par rapport au deuxième témoin négatif (Essai 12).

A partir de la dose 0.225×10^{-3} g/ml (Essai 13), on constate qu'il y a une proportionnalité entre la dose et l'effet jusqu'à la concentration $1,37 \times 10^{-2}$ g/ml (Essai 17), à partir de laquelle on atteint le maximum.

Ces résultats montrent que l'extrait aqueux a un effet plus prononcé que l'huile essentielle.

Discussion

L'effet antispasmodique du Thym a été mis en évidence par de nombreux travaux tels que ceux de REITER et BRANDT (1985) qui ont démontrés son effet relaxant sur les muscles lisses de l'ileum et des trachées isolés de cobayes et préalablement contractés par différents agents ; selon ces mêmes auteurs, cet effet a été plus prononcé sur les muscles lisses de l'ileum.

L'efficacité du Thym contre les contractions serai liée à sa teneur en composés phénoliques tel que le carvacrol (63.306 %) et le Thymol (1.867 %), et en flavonoïdes [130; 257]. Ils agissent en bloquant les canaux de Calcium [7; 258; 64], les flavonoïdes agissent également en inhibant la réponse des récepteurs membranaires spécifiques à l'action des stimulants (acétylcholine, noradrénaline) [259].

Il a été démontré que l'extrait aqueux et le macéré de *Thymus vulgaris L.* a un effet spasmodique sur les préparations in vitro de la trachée de cobayes, et

qu'il existait une corrélation entre les concentrations des extraits et l'effet relaxant sur les trachées contractées [28; 145].

Le type d'inhibition de l'HE est de type non compétitif, elle agit par inhibition du transfert des ions calcium Ca^{2+} à travers les canaux calciques stimulés par la différence de potentiel (ddp), et /ou par blocage de la libération du calcium liée intracellulaire (Signal calcium) [43, 64; 277; 106].

D'autres composés peuvent être à l'origine de cette activité antispasmodique remarquable et qui font partie de la composition de la plante étudiée, ce sont l'apigénine, le borneol, l'acide caféique, caryophyllène, Kaempferol, limonène, linalool, myrcène, pinène et terpène-4-ol [181; 271; 72; 118].

CONCLUSION

Le Thym est une plante très connue par ses vertus thérapeutiques. Le présent travail nous a permis d'avoir une idée sur les métabolites secondaires que peut synthétiser cette plante et sur les éventuelles activités biologiques dont ils pourraient être à l'origine, ainsi que sur la toxicité des composés volatils extraits de la plante.

Ainsi, les coupes histologiques ont permis de déceler plusieurs sites de sécrétion et de stockage des huiles essentielles de *T.vulgaris* L., situés dans la partie aérienne de la plante. Il s'agit des trichomes glanduleux dispersés au niveau de l'épiderme foliaire des deux faces supérieur et inférieur des feuilles, au niveau de l'écorce de la tige (épiderme), et au niveau des pièces florales : calice (face externe) et corolle (face externe et interne). D'autres cellules ont été observées au niveau de la couche cellulaire parenchymateuse la plus profonde de l'écorce ; ces cellules sont en faible nombre et semblent synthétiser les huiles essentielles.

Par ailleurs, nous avons pu révéler par les réactions de caractérisation, la présence dans la plante de mucilage, caroténoïdes, d'antraquinones libres, de tannins catéchiques et d'alcaloïdes.

Le pourcentage des minéraux est évalué à 10.27 %.

Selon les résultats obtenus, on constate que 1 g de feuilles sèches de *T. vulgaris* L. renferme environ 22.01 mg de composés phénoliques totaux. L'analyse par HPLC a révélée la présence d'acide caféique (1.1 mg /g de feuilles sèches), d'acide chlorogénique (0.983 mg/g), d'apigénine (0.363 mg/g), de Kaempferol (0.195 mg/g), de fisetine (0.182) et de rutoside (0.1 mg/g). La teneur en flavonoïdes totaux est approximativement de 4.356 mg/g, celle des chlorophylles est de 1.5596 mg/g pour la chlorophylle a et de 1.124 mg/g pour la chlorophylle b; ainsi la chlorophylle totale constitue 2.67 mg/g de matière végétale sèche. Les caroténoïdes sont présent chez *Thymus vulgaris* L. en raison de 38.24 mg/ 100 g de feuilles sèches.

Nous avons identifié 20 composés différents au niveau de l'échantillon d'huile essentielle extraite à partir de la plante récoltée durant le mois de mai (la durée d'extraction est de 3 heures), les pics majoritaires représentent le carvacrol (63.3 %), le p-cymène (21.90%) et le linalool (2.77 %). Selon nos résultats, trente

minutes d'extraction n'ont pas suffi pour extraire la totalité des composants de l'huile, c'est surtout ceux qui sont plus volatils qui ont été extraits en premier, nous avons identifié 14 composés, ceux qui présentent la fraction majoritaire sont le carvacrol (37.7 %), le p-cymène (35.61%) et le γ -terpinène (6.72%). On constate que la composition de l'huile change lorsque la plante est cueillie hors la période de récolte, car on note la présence de deux nouveaux composés (carvone et spathulenol) et l'arrêt de synthèse de l'humulène et du dihydrocarvone-cis ; cela dit, la synthèse des composants de l'huile est fortement influencée par les changements climatiques (Saison).

Les résultats de la toxicité aiguë de l'huile essentielle de *T.vulgaris* L. ont permis de la classer parmi les huiles légèrement toxiques (indice de toxicité est de 4), la DL50 étant de 1.08 g/ Kg de poids vif de l'animal. C'est une huile qui est très irritante à l'état pur.

L'huile essentielle de *T.vulgaris* L. possède une action fongicide remarquable sur les espèces de champignons testées, la CMI obtenue pour *Monilia fructigena* est de 0.05 %, et celles obtenues pour les autres espèces (*Nectria galligena*, *Venturia inaequalis* et les deux pathovars de *Peronospora graminea*) sont inférieures à 0.05 %. L'action de l'huile essentielle sur *Candida albicans* est plus forte (CMI égale à 1.25%) comparée à celle de l'extrait aqueux (CMI est de 15%). Cette action reste toujours supérieure chez les espèces bactériennes testées : *Staphylococcus aureus* (CMI est de 0.01%), *Staphylococcus épidermidis* (0.03%), *Bacillus subtilis* (1%), *Sarcina lutea* (5%), *Klebsiella pneumoniae* (25%), *Escherichia coli* (27%). Quant à l'extrait aqueux, seules les croissances de *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* ont été inhibées par ce dernier, les CMI étant respectivement de 5%, 15 % et 20%.

En dernier lieu, nous avons tenté par une étude pharmacologique de révéler les éventuelles activités biologiques de *T.vulgaris* L. ; les résultats obtenus ont montré que l'activité réductrice des extraits méthanoliques de la plante mesurée par la méthode au Trichlorure ferrique FeCl₃ est très élevée (Absorbance de l'extrait à 0.11 mg/ml est de 0.9134).

D'autre part, nous avons démontré que l'extrait aqueux de la plante peut avoir un effet sur la tension artérielle ; en effet, l'injection de doses croissantes de l'extrait aqueux (0.66%, 1%, 2%, 5% et 10%) a provoqué des chutes de tension proportionnelles aux doses qui sont respectivement de 17.5 mmHg, 25 mmHg,

37.5 mmHg, 52.5 mmHg et 60 mmHg. Cette dernière valeur a été obtenue après injection d'histamine à 0.1 γ qui est une substance hypotensive.

Contrairement aux autres tests, celui de l'activité antipyrétique a démontré qu'au lieu d'avoir un effet antipyrétique, il ya plutôt un effet pyrétogène.

Par voie orale, l'huile essentielle de notre plante a provoquée une baisse sensible de l'inflammation jusqu'à disparition complète de l'œdème des pattes pour la forte dose (4.4%), et par application dermique, l'effet anti-inflammatoire est plus rapide et plus prononcé.

La plus forte dose d'extrait aqueux testées (0.22 g/ml) s'est révélée avoir plus d'effet que le Diclofenac à 0.2 mg/ml (dose suffisante pour réduire l'inflammation). Toutes les doses d'extrait aqueux (0.075 g/ml, 0.15 g/ml, 0.22 g/ml) administrées par voie orale ont agit contre l'évolution de l'inflammation, tandis que celle administrée par injection en sous plantaire s'est avérée inefficace. La comparaison entre les lots nous mène à constater un effet plus important de l'extrait aqueux.

L'effet réducteur des spasmes de l'huile essentielle n'apparaît qu'à partir de la concentration de 0.0006%, cet effet est proportionnel à la dose d'huile essentielle injectée jusqu'à la concentration de 0.002% et de 0.2% où on atteint un maximum d'effet. Les mêmes constatations ont été faites pour l'extrait aqueux où on remarque qu'à partir de la dose 0.225×10^{-3} g/ml, il ya une proportionnalité entre la dose et l'effet jusqu'à la concentration 1.37×10^{-3} g/ml à partir de laquelle on atteint le maximum. L'effet de l'extrait aqueux est plus prononcé que l'huile essentielle.

A l'issu de ce travail, nous pouvons dire que le *T. vulgaris L.* est une plante très intéressante du point de vue thérapeutique. Il serai préférable que cette étude soi complétée et approfondie par d'autres expériences afin de mieux connaitre les mécanismes d'action des composants du Thym sur les différents systèmes de l'organisme, et donc mieux comprendre ses effets thérapeutiques.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

CMI	: Concentration minimale inhibitrice.
CPG/SM	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
DL ₅₀	: Dose létale de 50 % des animaux testés
EU	: Endotoxine Unit.
EA	: Extrait aqueux.
EP	: Eau physiologique.
HE	: Huile essentielle.
HPLC	: Chromatographie en phase liquide à haute performance.
HT	: Huile de tournesol.
His	: Histamine.
IP	: Indice d'irritation primaire cutanée.
LAL	: Lysat d'Amoebocytes de Limule.
mmHg	: Millimètre de mercure
ml	: Millilitre.
mm	: Millimètre
mg	: Milligramme.
S. P	: Sous plantaire.
<i>T. vulgaris L.</i>	: <i>Thymus vulgaris L.</i>
TNBS	: L'acide 2,4,6 trinitrobenzenesulphonique.
UV	: Ultra violet.
ΔT°	: Variation de la température.
$^{\circ}\text{C}$: Degré Celsius.
λ	: Seuil de sensibilité du réactif LAL (Unité en EU / ml).
γ	: $\mu\text{g/ml}$

APPENDICE B

MATERIEL D'ETUDE

Matériel non biologique

- Ampoule à décanter.
- Pipettes graduées.
- Soxhlet.
- Agitateur magnétique.
- Mortier.
- Plaque chauffante.
- PH metre.
- Appareil sonificateur.
- Appareillage de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).
- Dispositifs de filtration et de microfiltration.
- Support.
- Etuve.
- Micropipettes à volume variable.
- Réfrigérateur.
- Microscope photonique
- Bec bensen.
- Bain-marie.
- Centrifugeuse.
- Boîtes de pétri 90mm de diamètre en plastique stérile.
- Pipettes pasteur stériles.
- Bistouri.
- Plaque chauffante.
- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- Cristalliseur.
- Barreau magnétique.
- Béchers.
- Flacons stériles.
- Balance de précision.

- Portoirs.
- Tubes à essai à vice et à orifice.
- Pipettes Pasteur.
- Pincés métalliques.
- Agitateur type Vortex.
- Enregistreur physiologique pour mesurer la tension artérielle muni d'un transducteur de pression.
- Canule intra-trachéale.
- Trousse de dissection.
- Canule intra-vasculaire.
- Table de chirurgie thermorégulée pour les petits animaux.
- Seringues.
- Balance pour la pesée d'animaux.
- Lampe à bras articulé avec éclairage d'appoint.
- Mors pour fixation de la mâchoire du chat.
- Agrafes et agrafeuse.
- Fil de suture en nylon.
- Bande à gaze.

Réactifs

- Myristate d'isopropyl.
- Gélose Soga Agar.
- Gélose Sabouraud.
- Rouge congo.
- Vert de méthyle.
- Acide acétique.
- Hypochlorite de sodium.
- Ethanol pour analyse (99.99%).
- Eau physiologique (NaCl à 9 ‰).
- Pentobarbital de sodium ou chloralose.
- Héparine.
- Histamine.

Les réactifs préparés

Réactif de trichlorure d'antimoine

30 g de trichlorure d'antimoine dissous dans 100 ml de chloroforme exempté d'alcool [96].

Réactif de Dragendorf

850 mg de tétraiodobismuthate (réactif de dragendorf) dissout dans un mélange (10 ml acide acétique glacial et 40 ml d'eau distillée). La solution obtenue est versée dans une autre solution de 8 g de iodure de potassium Ki et 20 ml d'eau distillée [96].

Gélose Pomme de terre Dextrose Agar (PDA) Selon GUIRAUD (1998)

- Pomme de terre.....200 g
- Glucose.....20 g
- Agar Agar.....15 g
- Eau distillée.....Ajuster à 1000ml.

Gélose Mueller Hinton (MH) Selon GUIRAUD (1998)

- Infusion de viande de bœuf.....300ml
- Hydrolysate de caséine.....17,5g
- Amidon.....1,5g
- Agar.....10g

APPENDICE C

LA TOXICITE AIGUE (DL50)



Figure 1 : Les lots de souris pour la détermination de la DL₅₀ (Original, 2009).



Seringue de gavage spéciale pour les souris

Seringue de gavage spéciale pour les rats

Figure 2 : Les seringues de gavage en verre (Original, 2009).

Conditions d'une animalerie conventionnelle de rongeurs :

- Température : 22 ° C ± 2.
- Hygrométrie : 55 % ± 10.
- Renouvellement de l'air : 10- 15 Volume / heure.
- Vitesse de l'air : 0.2 – 0.3 m/sec.
- Nyctémère naturel [241; 264; 147].

Tableau 1: Mortalité des souris enregistrée durant 15 jours après l'administration par voie orale des doses d'Huile essentielle de *Thymus vulgaris L.* :

Doses \ Jours	Jours															Pourcentage de mortalité	Totalité de souris mortes	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
Témoin(Tween 80+ Eau physiologique)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	0/6
0.5 g/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	0/6
0.75 g/kg	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33%	2/6
1 g/kg	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66.66%	4/6
1.5 g/kg	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66.66%	4/6
2 g/kg	2	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	100%	6/6
3 g/kg	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%	6/6
4 g/kg	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%	6/6

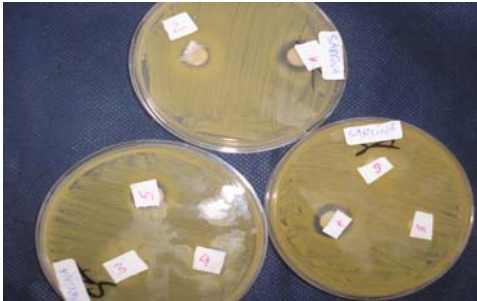
Tableau 2: La tolérance cutanée des lapins à l'huile essentielle de *Thymus vulgaris L.* exprimée en œdème et en érythème

Lot		1						2						3						4						5						6					
Doses (%)		100						10						1						0.02						0.002						0.0006					
Lapins		1		2		3		1		2		3		1		2		3		1		2		3		1		2		3		1		2		3	
		N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S		
Temps (Heure)	24h	3	3	3	4	3	4	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Oedème	
		4	4	4	4	4	4	1	1	1	2	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Erythème		
	72h	2	2	1	2	2	3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Oedème		
		3	4	3	4	4	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Erythème		
Moyennes par lapin		6.25		6.25		7		1		1.25		1.5		0.5		0.25		0.75		0		0		0		0		0		0		0		0			
Moyennes par lot		6.5						1.25						0.5						0						0											

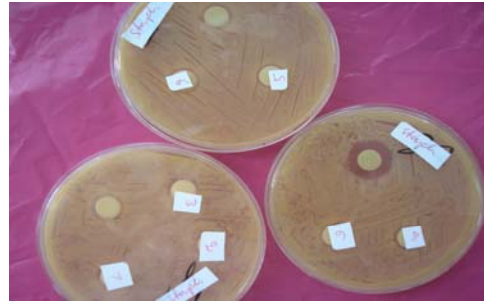
N : Le flonc non scarifié.
S : Le flonc scarifié.

APPENDICE E

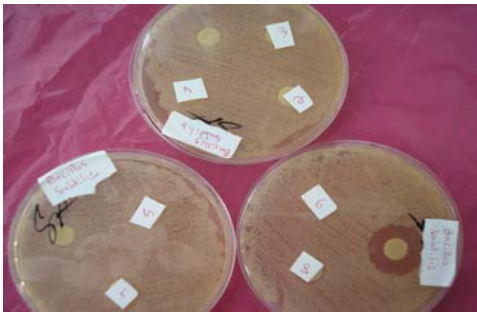
ACTIVITE ANTIMICROBIENNE



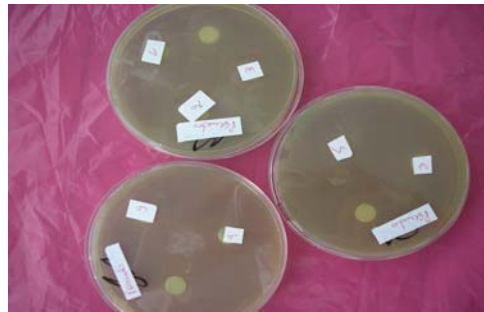
Diamètres d'inhibition de
Sarcina lutéa



Diamètres d'inhibition de
Staphylococcus aureus



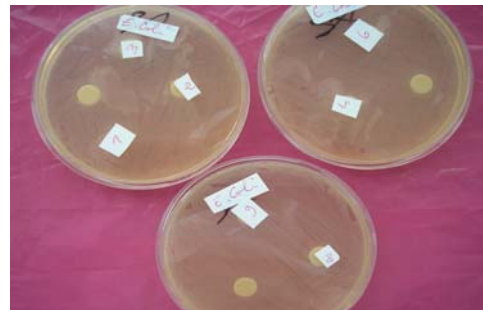
Diamètres d'inhibition de
Bacillus subtilis



Diamètres d'inhibition de
Pseudomonas aeruginosa

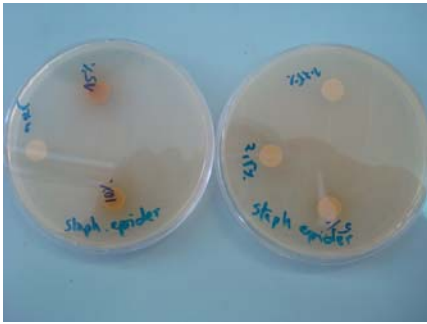


Diamètres d'inhibition de
Klebsiella pneumoniae



Diamètres d'inhibition de
Escherichia coli

Figure 3: Diamètres d'inhibition des souches bactériennes par l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. (Originale, 2009).



Diamètres d'inhibition de *Staphylococcus epidermidis*



Diamètres d'inhibition de *Staphylococcus aureus*



Diamètres d'inhibition de *Klebsiella pneumoniae*



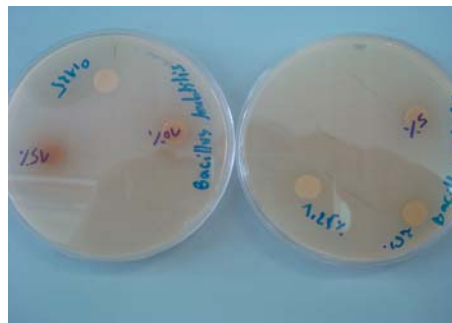
Diamètres d'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa*



Diamètres d'inhibition de *Sarcina lutea*



Diamètres d'inhibition d' *Escherichia coli*



Diamètres d'inhibition de *Bacillus subtilis*

Figure 4: Diamètres d'inhibition des souches bactériennes par l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* L. (Originale, 2009).



Figure 5 : Lecteur de diamètre des zones d'inhibitions (Originale, 2009).

APPENDICE F

ACTIVITE ANTIPYRETIQUE



Figure 6 : Cage spéciale pour lapin en inox (Originale, 2009).



Figure 7: Vaccinostyle (Originale, 2009).



Figure 8 : Boite à contention spéciale pour immobiliser les lapins pour le test des pyrogènes (Originale, 2009).



Figure 9: Injection en intraveineuse (à travers la veine marginale de l'oreille) de la solution à tester (Originale, 2009).



Membrane de microfiltration stérilisante à porosité de $0.22 \mu\text{m}$



Figure 10: Stérilisation par microfiltration de l'extrait aqueux pour le test de l'effet antipyrétique (Originale, 2009).

Figure 11: Stérilisation à froid de la dilution d'HE le test de l'effet antipyrétique par microfiltration (Originale, 2009).

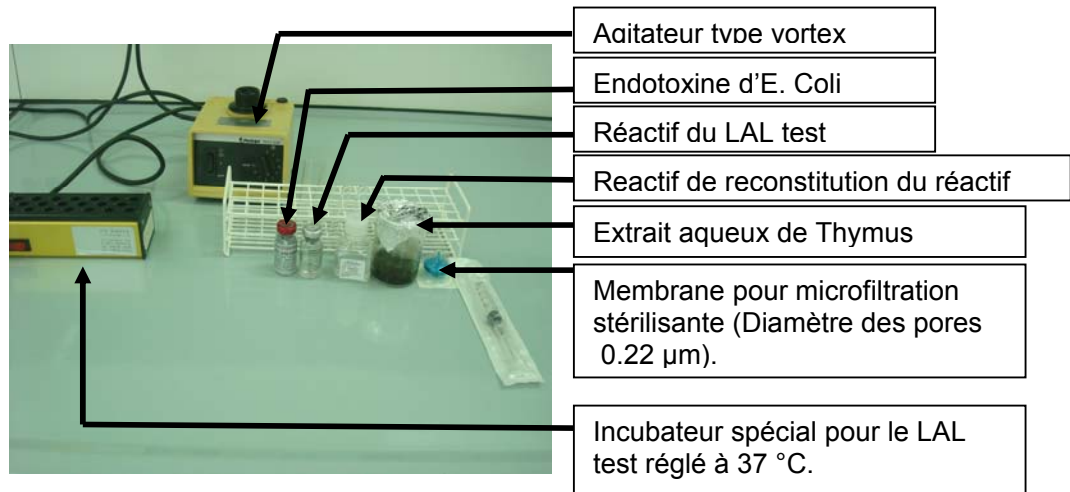


Figure 12 : Matériel nécessaire pour la réalisation du test LAL (Originale, 2009).



Figure 13: Vue de dessous d'un Limule.

Les conditions de stabulation des lapins

- Température 19 °C \pm 3.
- Taux d'humidité 40%- 65 %.
- Eclairage respectant le nyctémère saisonnier naturel.
- Renouvellement dynamique de l'air (climatisation centralisée).
- L'eau de boisson et l'aliment industriel répondent aux normes internationales et sont distribués ad libitum.
- Les cages de stabulation en inox répondent aux normes spécifiques aux animaux de laboratoire [269; 139].

TEST DE RECHERCHE DES PYROGENES

essai à blanc

CENTRALE THERMOMETRIQUE AUTOMATIQUE N° :

N° BOX		PREPARATION			N° BOX		PREPARATION			N° BOX		PREPARATION		
					2-4 5-6		Solution physiologique (s.p)			8-10 11-12		Solution physiologique (s.p)		
N° Box	Secteur	Couleur	Numéro Animal	Poids de l'animal (g)	Dose	Température à 75 mn	Température à 105 mn	Température Moyenne	Température Maximale	Variation de température	OBSERVATION			
1	DROIT	Noir												
2		Violet	1	2700		38,7	38,6	38,6	38,9	0,3				
3		Bleu												
4		Vert	2	2400		38,7	38,8	38,7	39,1	0,4				
5		Marron	3	2000		39,1	39,0	39,0	39,3	0,3				
6		Rouge	4	2600		38,6	38,7	38,6	38,7	0,1				
7	GAUCHE	Noir												
8		Violet	5	2200		38,7	38,8	38,7	39,2	0,5	Lapin à ne pas utiliser			
9		Bleu												
10		Vert	6	2100		38,9	39,0	38,9	39,2	0,3				
11		Marron	7	2500		38,3	38,3	38,3	38,8	0,5	Lapin à ne pas utiliser			
12		Rouge	8	2400		39,4	39,4	39,3	39,7	0,4				

L'analyste

Le Chef de Service

Tableau 3 : Résultat de l'essai à blanc du test de l'activité antipyrétique.

Test proprement dit.

TEST DE RECHERCHE DES PYROGENES

essai 1 :

CENTRALE THERMOMETRIQUE AUTOMATIQUE N° :

N° BOX		PREPARATION			N° BOX		PREPARATION			N° BOX		PREPARATION		
					2-4-5		Solution d'endotoxine à 5 EU/ml + extrait aqueux de Thym à 5%			10-11-12		Solution d'endotoxine à 5 EU/ml (c-à-d 5 EU / kg de poids du lapin) (c-à-d 5%)		
N° Box	Secteur	Couleur	Numéro Animal	Poids de l'animal (g)	Dose	Température à 75 mn	Température à 105 mn	Température Moyenne	Température Maximale	Variation de température	OBSERVATION			
1	DROIT	Noir												
2		Violet		2600		38,9	39,0	38,9	41,1	2,2				
3		Bleu												
4		Vert		2400		38,6	38,6	38,6	39,8	1,2				
5		Marron		2000		38,9	38,9	38,9	39,9	1,0				
6		Rouge												
7	GAUCHE	Noir												
8		Violet												
9		Bleu												
10		Vert		2200		38,8	38,8	38,8	40,2	1,4				
11		Marron		2400		38,8	38,8	38,8	39,7	0,9				
12		Rouge		2400		38,8	38,9	38,8	39,6	0,8				

L'analyste

Le Chef de Service

Tableau 4 : Effet de l'extrait aqueux à (Double concentration) et de l'endotoxine sur l'évolution des températures des lapins.

TEST DE RECHERCHE DES PYROGENES

essai 2 :

CENTRALE THERMOMETRIQUE AUTOMATIQUE N° :

N° BOX		PREPARATION			N° BOX		PREPARATION			N° BOX		PREPARATION		
N° Box	Secteur	Couleur	Numéro Animal	Poids de l'animal (g)	Dose	Température à 75 mn	Température à 105 mn	Température Moyenne	Température Maximale	Variation de température	OBSERVATION			
					6 - 8 12	Solution d'endotoxine à 5 EU/ml + extrait aqueux de thym à 2,5%.								
1	DROIT	Noir												
2		Violet												
3		Bleu												
4		Vert												
5		Marron												
6		Rouge			2700	38,7	38,9	38,8	40,0	1,2				
7	GAUCHE	Noir												
8		Violet			2200	39,3	39,3	39,3	41,3	2,0				
9		Bleu												
10		Vert												
11		Marron												
12		Rouge			2600	39,0	39,1	39,0	40,1	1,1				

L'analyste

Le Chef de Service

Tableau 5 : Effet de l'extrait aqueux (Simple concentration) sur l'évolution des températures des lapins ayant reçu de l'endotoxine.

TEST DE RECHERCHE DES PYROGENES

essai 3 :

CENTRALE THERMOMETRIQUE AUTOMATIQUE N° :

N° BOX		PREPARATION			N° BOX		PREPARATION			N° BOX		PREPARATION			
N° Box	Secteur	Couleur	Numéro Animal	Poids de l'animal (g)	Dose	Température à 75 mn	Température à 105 mn	Température Moyenne	Température Maximale	Variation de température	OBSERVATION				
					1-47	Solution d'endotoxine à 5 EU/ml injectée en I.V + Solution huileuse d'HEC 0,02 ml HE/ml H2O injectée en I.M après filtration.									
1	DROIT	Noir		3200		38,9	39,0	38,9	40,5	1,6					
2		Violet													
3		Bleu													
4		Vert			3300		38,8	38,8	38,8	39,0	0,2				
5		Marron													
6		Rouge													
7	GAUCHE	Noir		3200		38,9	39,0	38,9	39,9	1,0					
8		Violet													
9		Bleu													
10		Vert													
11		Marron													
12		Rouge													

L'analyste

Le Chef de Service

Tableau 6 : Effet de l'huile essentielle sur l'évolution des températures des lapins ayant reçu de l'endotoxine.

TEST DE RECHERCHE DES PYROGENES

essai 4 :

CENTRALE THERMOMETRIQUE AUTOMATIQUE N° :

N° BOX		PREPARATION		N° BOX		PREPARATION		N° BOX		PREPARATION		N° BOX		PREPARATION	
				2-3-4		Solution d'endotoxine à 5EU/ml + solution de per falgan 10mg/ml									
N° Box	Secteur	Couleur	Numéro Animal	Poids de l'animal (g)	Dose	Température à 75 mn	Température à 105 mn	Température Moyenne	Température Maximale	Variation de température	OBSERVATION				
1	DROIT	Noir													
2		Violet		2900		39,0	38,9	38,9	39,3	0,4					
3		Bleu		3000		39,8	39,6	39,7	39,2	0,0					
4		Vert		3200		39,0	38,8	38,9	38,5	0,0					
5		Marron													
6	Rouge														
7	GAUCHE	Noir													
8		Violet													
9		Bleu													
10		Vert													
11		Marron													
12		Rouge													

L'analyste

Le Chef de Service

Tableau 7 : Effet du perfalgan sur l'évolution des températures des lapins ayant reçu de l'endotoxine.

TEST DE RECHERCHE DES PYROGENES

essai 5 :

CENTRALE THERMOMETRIQUE AUTOMATIQUE N° :

N° BOX		PREPARATION		N° BOX		PREPARATION		N° BOX		PREPARATION		N° BOX		PREPARATION	
				2-4-11		Extrait aqueux à 2,5% seule.		7-8-12		Huile essentielle à 0,002ml/dl seule.		1-6-10		Extrait aqueux de Thym à 5% seule.	
N° Box	Secteur	Couleur	Numéro Animal	Poids de l'animal (g)	Dose	Température à 75 mn	Température à 105 mn	Température Moyenne	Température Maximale	Variation de température	OBSERVATION				
1	DROIT	Noir		2500		38,8	38,8	38,8	39,8	1					
2		Violet		2800		39,5	39,2	39,3	41,1	1,8					
3		Bleu													
4		Vert		2900		39,3	39,3	39,3	39,7	0,4					
5		Marron													
6		Rouge		2900		38,4	38,5	38,4	39,7	1,3					
7	GAUCHE	Noir		2900		38,7	38,7	38,7	39,2	0,5					
8		Violet		2900		38,7	38,7	38,7	40,6	1,9					
9		Bleu													
10		Vert		2600		39,1	39,1	39,1	40,6	1,5					
11		Marron		3000		39,8	39,4	39,6	40,9	1,3					
12		Rouge		3000		38,7	38,8	38,7	39,2	0,5					

L'analyste

Le Chef de Service

Tableau 8 : Effet de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux (Simple et double concentration) sur l'évolution des températures des lapins ayant reçu de l'endotoxine.

APPENDICE G

ACTIVITE ANTIINFLAMMATOIRE

Tableau 9: Evolution de l'inflammation (moyenne des épaisseurs des pattes des Rats exprimées en millimètre) en fonction du temps et du traitement :

temps (min) Essai	Avant injection E_{i1}	Après injection E_{i2}	30	60	90	120	150	180	210
1	5.11	6.85	6.08	5.8	5.67	5.55	5.49	5.4	5.37
2	5.27	7.27	6.48	5.83	5.44	5.27	5.27	5.27	5.27
3	5.24	6.67	6.06	5.39	5.28	5.29	5.25	5.24	5.24
4	4.67	6.56	6.36	6.34	6.29	6.15	5.77	5.52	5.3
5	5.13	6.89	6.08	5.99	5.7	5.55	5.44	5.4	5.34
6	4.84	7.07	6.2	5.58	5.39	5.01	4.84	4.84	4.84
7	5.10	7.08	6.92	6.92	6.93	7.21	7.48	7.08	6.97
8	4.86	7.47	5.22	4.94	4.86	4.86	4.86	4.86	4.86
9	4.84	6.8	5.54	5.67	5.79	5.88	6	6.16	6.18
10	5.13	6.93	5.5	5.61	6.22	6.32	6.37	6.43	6.47
11	5.34	6.93	6.06	5.88	5.93	5.62	5.53	5.46	5.4

Tableau 10: Résultats de l'épaisseur moyenne de l'œdème (inflammation) :

Temps (min) Lot	30	60	90	120	150	180	210
1	0.97	0.69	0.56	0.44	0.38	0.29	0.26
2	1.21	0.56	0.17	0	0	0	0
3	0.82	0.15	0.04	0.01	0	0	0
4	1.69	1.67	1.62	1.48	1.1	0.85	0.63
5	0.95	0.86	0.57	0.42	0.31	0.27	0.21
6	1.36	0.74	0.55	0.17	0	0	0
7	1.82	1.82	1.83	2.11	2.38	1.98	1.87
8	0.36	0.08	0	0	0	0	0
9	0.7	0.83	0.95	1.04	1.16	1.32	1.34
10	0.37	0.48	1.09	1.19	1.24	1.3	1.34
11	0.72	0.54	0.59	0.28	0.19	0.12	0.06

$$E_0 = E_f - E_{i1}$$

E_0 : Epaisseur de l'œdème.

E_f : Epaisseur final de la patte (mesurée chaque demi heure).

E_{i1} : Epaisseur initiale de la patte avant injection de la carraghénine ou de l'eau physiologique.

E_{i2} : Epaisseur initiale de la patte après injection de la carraghénine ou autre produits.

Tableau 11 : Evolution du pourcentage de réduction de l'œdème en fonction du temps :

Temps (min) \ Essai	30	60	90	120	150	180	210
1	44.25	60.34	67.81	74.71	78.16	83.33	85.05
2	39.5	72	91.5	100	100	100	100
3	61	89.51	97.20	96.5	99.3	100	100
4	10.58	11.64	14.28	21.69	41.79	55.02	66.66
5	46.02	51.13	67.61	76.13	82.38	84.65	88.06
6	39.01	66.81	75.33	92.23	100	100	100
7	8.08	8.08	7.57	< 0	< 0	0	5.55
8	86.2	96.93	100	100	100	100	100
9	64.28	57.65	51.53	46.93	40.81	32.65	31.63
10	79.44	73.33	39.44	33.88	31.11	27.77	25.55
11	54.71	66.03	62.89	82.38	88.05	92.45	96.22

$$pR_0 = \frac{E_{i2} - E_f}{E_{i2} - E_{i1}} \times 100$$

PRO : Pourcentage de réduction de l'œdème.
 E_f : Epaisseur finale de la patte (mesure chaque demi heure).
 E_{i2} : Epaisseur initiale de la patte après injection de la carraghénine ou autre produits.

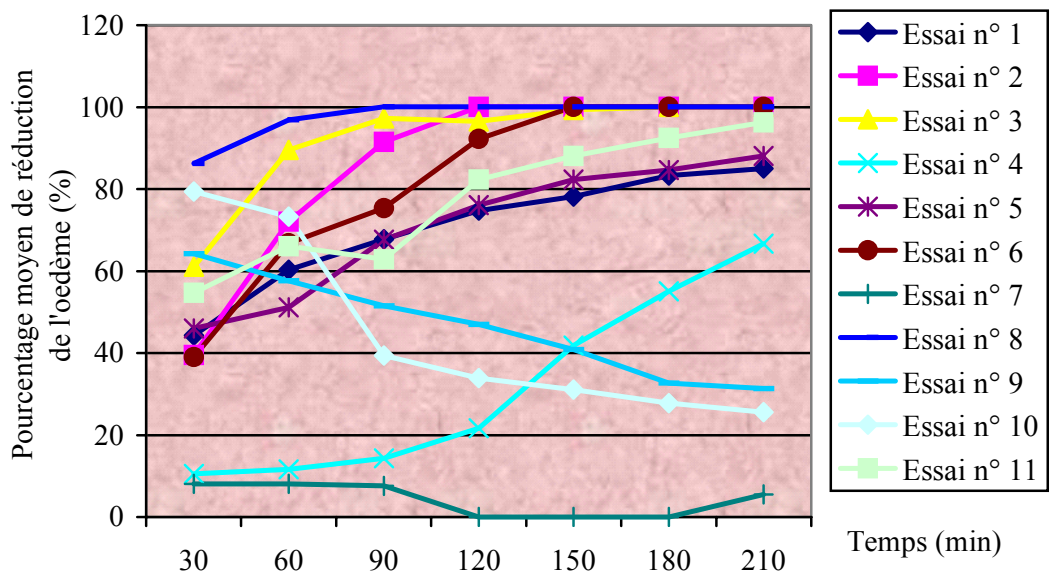


Figure 14 : Evolution du pourcentage moyen de réduction de l'œdème (réduction de l'inflammation) en fonction du temps.

GLOSSAIRE

Irritation Une réponse inflammatoire réversible locale d'une peau vivante normale à une lésion causée par une application d'une substance toxique, sans l'implication d'un mécanisme immunologique [76].

Produit irritant Une substance est dite irritante lorsqu'elle cause une inflammation et d'autres signes d'irritation, particulièrement de la peau, dès le premier contact ou exposition. Une réaction d'irritation ne dépend pas du mécanisme de la sensibilité [76].

La Dose létale 50 (DL50) C'est la quantité statistiquement établie d'une substance, dont on peut s'attendre à ce qu'elle provoque la mort de 50 pour cent des animaux d'expérience dans un temps donné, après administration unique par la voie indiquée [193 ; 76 ; 182 ; 127 ; 238].

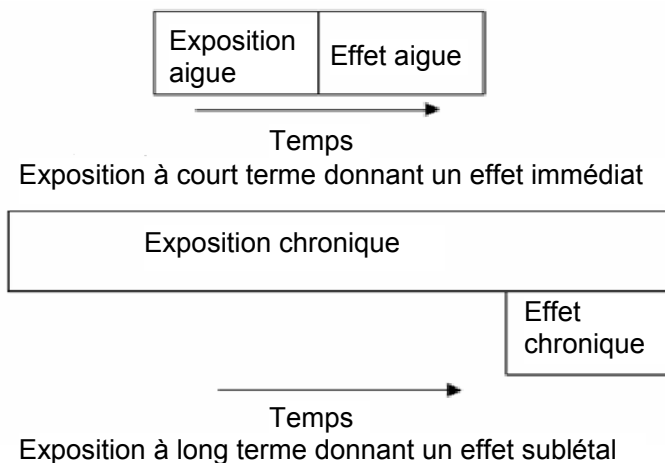


Figure 1: Exemples de scénarios d'exposition/effet qui aboutissent à la toxicité aiguë (a) ou à la toxicité chronique (b). [127]

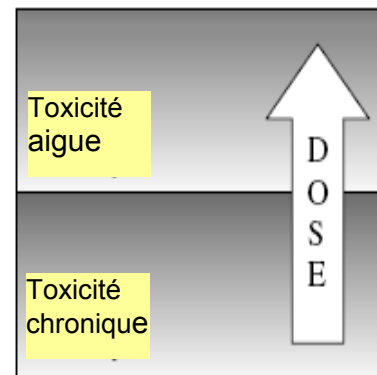


Figure 2 : Relation (dose parlant) entre la toxicité aiguë et la toxicité chronique. [127]

Produit anti-inflammatoire Un produit est dit anti-inflammatoire lorsqu'il aide à combattre les processus inflammatoires liés à une infection ou un rhumatisme ou autre [33].

REFERENCES

1. Abdelgawad, M.M., Omer, E.A., "Effect of essential oils of some medicinal plants on phytonematodes. ", *Anzeiger Schädlingskunde. Pflanzenschutz umweltschutz* (Indicator vermin's customer. environmental plants protection), V. 68, n° 4, (1995), 4-82.
2. Abe, S., Maru yama, N., Hayama, K., Ishibashi, H., Inoue, S., Oshima, H., Yamaguchi, H., "Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils. ", *Mediators Inflamm*, 12, (2003), 323-328.
3. Ahmad, M., Gilani, A-U-H. , Aftab, K., Ahmad, V.U., "Effects of kaempferol-3-O-rutinoside on rat blood pressure.", *Phytotherapy Research*, V.7, Issue 4, (1992), 314 - 316.
4. Ahmed, A. A., Mahmoud, A. A., Williams, H. J., Scott, A. I., Reibenspies, J. H., Mabry, T. J., "New sesquiterpene a-methylene lactones from the Egyptian plant *Jasonia candicans*.", *Journal of Natural Products*, V.56, (1993), 1276–1280.
5. Aichouni, M., Abada, A., Mostefa Sari, F., "Caractérisation et effet antifongique de H.E de *Lavendula stoechas L.* ", *Projet de fin d'étude pour l'obtention du diplôme des études universitaires appliquées en biologie. Centre universitaire de Khemis Miliana (C.U.K.M.)*, (2008), 80p.
6. Amaral, J. A., Ekins, A., Richards, S. R., Knowles, R., "Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. ", *Applied Environmental Microbiology*, V.64, (1998), 520–525.
7. Amparo Blázquez, M., Catret, M., Zafra-Polo, M. C., "Effects on rat uterine and aorta strip smooth muscle of *Thymus leptophyllus* extract.", *Journal of Ethnopharmacology*, V.45, Issue 1, January (1995), 59-66.
8. Anderson, D., Conning, D. M., "Experimental toxicology, the basic issues.", second edition, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, (1993), 566 p, 8-10.
9. Arnal-Schnebelen, B., Goetz, P., Paris, M., "Santé reference : Phytothérapie : La santé par les plantes.", *Selection du reader's Digest.Vidal*, Canada, (2007), 448 p, 215, 428.
10. Arpino, P., "Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse I.", *Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, partie 1* : 490, (2008), 18 p, 4- 12.

11. Association Française de Normalisation " AFNOR ", " Les huiles essentielles ; Analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire chirale méthodes générales ", T75-425, Mai (1997).
12. Association Française de Normalisation " AFNOR ", "Recueil des normes, Les huiles essentielles", Monographies relatives aux huiles essentielles (H à Y), Tome 2, Paris, (2000), 661-663.
13. Auclair. J., Côté. I., " Extraction d'huiles essentielles de conifères.", Expo-journal, rapport interne, (2002), 11 p, 3,4.
14. Aujard. Y., " Infections nosocomiales en pédiatrie.", Médecine et maladies infectieuses, V.25 (Suppl), (1999), 36- 43.
15. Ayafor. J. F., Tchuendem. M. H. K., Nyasse. B., Tillequin, F., Anke, H., " Novel bioactive diterpenoids from *Aframomum aulacocarpos*.", Journal of Natural Products, V.57, n°7, (1994), 917–923.
16. Bakkali.F., Averbeck. S., Averbeck.D., Idaomar.M. " Biological effects of Essential oils ", Food chemistry and toxicology, V.46, Issue 2, (February 2008), 446 - 475.
17. Balasundram N., Ai T. Y., Sambanthamurthi R., Sundram K.and Samman S., "Antioxidant properties of palm fruit extracts.", Asia Pac J Clin Nutr, V. 4 , n°4, (2005), 319- 324.
18. Bardeau. F. " Les Huiles Essentielles : Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. ", Fernand Lanore, Paris, (1976), 289 p, 33, 34.
19. Barnes .J., Anderson .L- A., Phillipson .J –D., " Herbal Medicines. ",Pharmaceutical Press (Ph .P), Third édition, London . Chicago USA , (2007), 721 p , 16-576.
20. Barre. J. T., Bowden. B. F., Coll. J. C., Jesus. J., Fuente. V. E., Janairo. G. C., Ragasa. C. Y., "A bioactive triterpene from *Lantana camara* .", Phytochemistry, V.45, n°2, (1997), 321–324.
21. Baydar. H.,Sagdiç. O., Özkan. G., Karadogan. T. " Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. ", Food control, V.15, n° 3, (April 2004), 169-172.
22. Beloued .A ., " plantes médicinales d'Algérie. ", offices des publications universitaires (OPU), Ben-Aknoun Alger, (2005), 284 P, 3, 4, 206.
23. Bendriss. H., " Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de : *Ruta chalepensis* et *Marrubium vulgare* .", Mémoire de magister en génie des procédés, Université Hassiba BENBOUALI, Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingénieur, Chlef, (2003), 156 p.

24. Bensalem.M., Bendjelloul.D., "Techniques histologiques: Théorie et pratique.", Office des Publications Universitaires (OPU), Alger, (1998), 109 p, 56,57.
25. Bernard. T., Perineau. F., Bravo. R., Delmas. M.,Gaset. A., " Extraction of Essential oils : Chemistry and technology ", Journal of chemistry informations, n° 298, (1988), 179-184.
26. Bernard. T., Perineau. F., Delmas. M., Gaset. A., " Extraction of essential oils by refining of plant materials.II : Processing of products in the dry state : Illicum verum hooker (Fruit) and Cinnamomum zeylanicum nees (Bark).", Flavor and fragrance journal, V. 4, n° 2, (1989), 85-90.
27. Bocchio. E., " Hydrodistillation des huiles essentielles – Théorie et applications. ", Revue des Parfums, Cosmétiques et Arômes, n°63, (1985), 61-62.
28. Boskabady. M. H. , Aslani. M. R., Kiani. S.,"Relaxant effect of Thymus vulgaris on guinea-pig tracheal chains and its possible mechanism(s).", Phytotherapy Research, V.20, Issue 1, (June 2005), 28 – 33.
29. Bouayed. J., Piri. K., Rammal. H., Dicko. A., Desor. F., Younos. C., Soulimani. R. "Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants." Food Chemistry, 104, Issue 1 , (March 2007), 364–368.
30. Bouchoux. G., Sablier. S., "Spectrométrie de masse : Applications. ", Techniques de l'ingénieur, Parie 2 : 646, (1997), 14 p, 2 - 12.
31. Bouchoux. G., Sablier. S., "Spectrométrie de masse : Principe et appareillage. ", Techniques de l'ingénieur, Parie 2 : 645, (1997), 32 p, 2, 3.
32. Bouhdid. S., Idaomar. M., Zhiri. A., Baudoux. D., Skali. N. S. et Abrini. J., "Thymus essential oils : Chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities", International congres of biochemistry, Biochemistry, natural Substances and environnement, (may 2006), 324-327.
33. Boullard. B., "Dictionnaire des plantes médicinales du monde: Réalités & Croyances.", ESTEM, paris, (2001), 660 p, 577, 581,583.
34. Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Figueiredoe. A.C., Barrosog. J.G., Pedrog. L.G., " Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus Hoff. et Link.* ", Journal of Food Chemistry, V.105, Issue 1, (2007), 146–155.
35. Bozin. B., Mimica –Dukic. N., Simin. N., Anackov. G., " Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. ", Journal Agriculture and Food Chemistry, V.54, n°5, (March 2006), 1822-1828.

36. Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C., "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. ", LWT- Food Science and technology, V. 28, Issue 1, (1995), 25-30.
37. Brantner. A.H., Pfeifhofer. H.W., Ercegovac. O., Males. Z., Plazibat. M., " Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus bracteosus* Vis. ex Benth. ", Flavour and Fragrance Journal, V.20, Issue 6, (2005), 596–600.
38. Bruneton. J., Hatton. C.K. " Pharmacognosy phytochemistry medicinal plants.", Lavoisier technique et documentation, Troisième édition, Paris et New York, (1995), 405-446.
39. Bruneton.J. "Pharmacognosie : Phytochimie des plantes médicinales", Lavoisier Tec et Doc, 2ème édition, Paris et New York , (1999), 1120 p, 286- 426.
40. Bukovsk. A., Cikos. S., Juhas. S., Ilkova. G., Rehak. P., Koppel. J., "Effects of a Combination of Thyme and Oregano Essential Oils on TNBS-Induced Colitis in Mice. ", Hindawi Publishing Corporation, Mediators of Inflammation, V. 2007, n°2, (August 2007), 1-9.
41. Burnie. G., Forrester. S., " Botanica : Encyclopédie de botanique et d'horticulture: plus de 10000 plantes du monde entier.", place des victoires, Paris, (2005), 1020 p, 885-887.
42. Burt. S.A., Reinders. R.D., " Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7.", Letters in Applied Microbiology, V.36, n°3, (March 2003), 162–167.
43. Cabo. J., Cabo. M. M., Crespo. M. E.n, Jimenez. J, Zarzuelo. A., " *Thymus granatensis* IV- pharmacodynamic study of its essential oil." , Fitoterapia, V.57, (1986), 173 – 178.
44. Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H., " Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer.", Life Sciences, V.74, n° 17, (March 2004), 2157–2184.
45. Cai. L., Wu. C. D., " Compounds from *Syzygium aromaticum* Possessing Growth Inhibitory Activity Against Oral Pathogens. ", journal of natural products, V.59, Issue 10, (October 1996), 913-1002.
46. Caillet.S., Lacroix. M., " Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobienne et leur application potentielles en alimentaire. ", (2007), 1-8.
47. Capecka. E., Mareczek. A., Leja. M., "Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species.", Food Chemistry, V.93, Issue 2, (November 2005), 223–226.

48. Caraffa .N , Perroti . C , Aili .S., “ Se soigner par les plantes. ”, BERTI , P III ,21, (1999), 118 P.
49. Case. L. P., “ The cat : Its behavior, Nutrition and health. ”, Willey-Blackwell, Iowa state press, USA, (2003), 392 p, 4.
50. Castrillo M., Viscaino D., Moreno E. et Latorraca Z., “ Chlorophyll content in some cultivated and wild species of the family lamiaceae.”, *Biologia plantarum*, V.44, n° 3, (2001), 423-425.
51. Caude. M. et Jardy. A., ” Chromatographie en phase liquide ; appareillage et applications.”, *Techniques de l'ingénieur, Traité analyse et caractérisation*, V.P 1 : 456, (1995), 17 p, 7.
52. Caude. M. et Jardy. A., “ Méthodes chromatographiques : Introduction.”, *Techniques de l'ingénieur, Traité analyse et caractérisation*, V.P 1 : 445, (1994), 6 p, 3, 4.
53. Chabot. S., Bel-Rhlid. R., Chenevert. R., Piche. Y. “Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. “, *New Phytologist*, V.122, n°3, (1992), 461–467.
54. Chan. A.S, Pang. H., Yip. E.C., Tam. Y.K., Wong. Y.H., “ Carvacrol and eugenol differentially stimulate intracellular Ca²⁺ mobilization and mitogen-activated protein kinases in Jurkat T-cells and monocytic THP-1cells. ”, *Planta Medica*, 71, n°7, (July 2005), 634-639
55. Charpentier. B., Hamon-Loreac'h.F., Harlay.A., Huard.A., Ridoux.L., Chansellé.S. “ Guide du préparateur en pharmacie. ” , Elsevier masson, troisième édition, Paris , (2008), 1343p, 774,1173.
56. Chemat. S., Lagha. A., AitAmar. H., Bartels. P.V., Chemat. F., ”Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. ”, *Flavour and Fragrance Journal*, V.19, Issue 3, (February 2004), 188 – 195.
57. Chen. B. H., Huang. J. H., “Degradation and metabolism of chlorophyll an and β - carotene as affected by various heating and illumination treatments.”, *Food Chemistry*, V.62, n° 3, (1998), 299-307.
58. Cimanga. K., Kambub. K., Tonab. L., Apersa. S., De Bruynea. T., Hermansa. N., Tottéa. J., Pietersa. L., Vlietincka. A. J., “ Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. ”, *Journal of Ethnopharmacology*, V.79, Issue 2, (February 2002), 213-220.

59. Comité Française du Parfum (C.F.P), " Parfum-L'expo : Le monde magique du parfum.", Fondation Claude Verdan, Lausanne, (2002), 20p, 10-12.
60. Concentino. S., Tuberoso. G., " In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. ", Journal of Applied Microbiology, V.29, n°2, (1999), 130-135.
61. Cowman. M. M., " Plant products as antimicrobial agents. ", clinical microbiology reviews, V. 12, n° 4, (October 1999), 564-582.
62. Cox. S. D, Mann. C.M, Markham. J.L, "The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). ", Journal of Applied Microbiology, n° 88, (2000), 170-175.
63. Crozier A., Clifford M. N., Ashihara .H., "Plant Secondary Metabolites : Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.", Blackwell Publishing Ltd, USA, (2006), 372p, 1-163.
64. Cruz. T., Jiménez. J., Zarzuelo. A. , Cabo. M. M., " The spasmolytic activity of the essential oil of Thymus baeticus Boiss in rats. ", Phytotherapy Research, V.3, Issue 3, (1989), 106–108.
65. Cseke. L. J., Kirakosyan. A., Kaufman. P. B., Warber. S. L., Duke. J. A., Briemann. H. L., "Natural Products from Plants. ", Taylor & Francis Group, Second edition, CRC Press, London et New York , (2006), 551 p , 14, 390, 391.
66. Cu. J.Q., Ziouani. H., Martel. J.P., Périneau . F. " Production d'huile essentielle de Badiane de Chine par turbo-distillateur. ", Parfums, Cosmétiques et Arômes, n° 93, (1990), 67-74.
67. Cubas C., Lobo M. G., Gonzalez M., "Optimization of the extraction of chlorophylls in green beans (Phaseolus vulgaris L.) by N,N-dimethylformamide using response surface methodology.", Journal of Food Composition and Analysis, V. 21, Issue2, (March 2008), 125–133.
68. Czemerys. R., "Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs.", Food Chemistry, V. 105, (2007), 940–949.
69. Daayf. F., Lattanzio. V., "Recent Advances in Polyphenol Research.", Blackwell Publishing Ltd, United Kingdom and USA, V.1, (2008), 393 p, 1, 2.
70. Dabbah. R., Edwards. V. M., Moats. W. A., " Antimicrobial action of some citrus Fruit oils on selected Food-Borne Bacteria.", Journal of Applied microbiology, V.19, n° 1, (1970), 27 – 31.

71. Dapkevicius. A., Van Beek. T., Lelyveld. G.P., Van Veldhuizen. A., De Groot. A., Linssen. J.P.H., Venskutonis. R., “ Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. ”, *Journal of Natural Products*, V.65, n°6, (June 2002), 892–896.
72. De Ortiz Urbina. J. J., Martin. M. L., Sevilla. M. A., Montero. M. J., Carron. R., San Roman. L., “Antispasmodic activity on rat smooth muscle of polyphenol compounds caffeic and protocatechic acids. “, *Phytotherapy Research*, V.4, Issue 2, (2009), 71 – 76.
73. Deba.F., Dang Xuan. T., Yasuda. M., Shinkichi. T., “Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. ”, *Food control*, V.19, Issue 4, (April 2008), 346-352.
74. Debete Judith. M., “ Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpiniaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad”, Thèse de Doctorat d'état en Pharmacie, Université de BAMAKO, Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie, Mali, (2005), 234 p, 135- 140.
75. Debillerbeck. V-G., Roques. C., Vanière. P., Marquier. P., “ Activité antimicrobienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. ”, *Revue d'hygiènes*, V. 10, n° 3, (2002), 248-251.
76. Delille.L., “ Les plantes médicinales d'Alger. ”, BERTI, Alger, (2007), 240 p, 14-216.
77. Derelanko. M. J., “ Toxicologists pocket handbook. “, CRC Press LLC, Boca Raton London New York Washington, (2000), 231 p, 145, 188, 202 , 225.
78. Desmares. C., Delerme. C., Laurent. A., “ Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. ”, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), Saint –Denis Cedex, France, (May 2008), 12.
79. DI Benedetto. D., Breuil. P., “ Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible. ”, *Techniques de l'ingénieur*, V.P 2 : 795, (1997), 2- 20.
80. Dixon. R. A., Dey. P. M., Lamb. C. J. “ Phytoalexins: enzymology and molecular biology.”, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, V.55, (1983), 1–136.
81. Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N., “Antioxidant activity of some metabolit medicinal plants extracts containing phenolic compounds. “, *Food Chemistry*, V.97, n°4, (2006), 654–660.

82. Dordevic. S., Petrovic. S., Dobric. S., Milenkovic. M., Vucicevic. D., Zizic. S., Kukic. J., “ Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil.”, *Journal of Ethnopharmacology* , V.109, Issue 3, (February 2007), 458–463.
83. Dorman H.J.D., Deans S.G., “ Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. ”, *Journal of Applied Microbiology*, V.88, n°2, (February 2000), 308–316.
84. Drouin. J., Arnal-Schnebelen. B., Goetz. p., Paris. M., “ Les médecines de la nature : 200 plantes pour se soigner. ”, *Selection du Reader’s Digest*, Montréal, (2003), 351 p, p : 215.
85. Duke. J. A., Bogenschutz-Godwin. M. J., Cellier. J., Duke. P.A. “Handbook of Medicinal Herbs.”, CRC Press LLC, London New York Washington, Deuxième édition, (2002), 870 p, 730,731.
86. Duraffourd. C., Lapraz. J-C., “ Traité de phytothérapie clinique : endobiogénie et médecine.”, Masson, Paris, (2002), 827 p, p : 6, 7.
87. Easter. M. C., “ Rapid Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry. ”, Interpharm /CRC, Boca Raton London New York Washington, (2003), 189 p, 126- 137.
88. Elhabazi. K., Dicko. A., Desor .F., Dalal. A., Younos. C., Soulimani .R.,” Preliminary study on immunological and behavioural effects of *Thymus broussonetii* Boiss, an endemic species in Morocco. ”, *Journal of Ethnopharmacology*, V.103 , n° 3, (February 2006), 413-419.
89. Elmastas. M., Gülçin. I., Işildak. O., Küfrevioğlu. O.İ., Ibaoglu. K., Aboul-Enein. H.Y., “ Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of Bay Leaf Extracts. ”, *Journal of the Iranian Chemical Society*, V.3, n° 3, (2006), 258-266.
90. El-Sayed. Y. S., Khalil. R. H., Saad. T. T., “ Acute toxicity of ochratoxin-A in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). ”, *Journal of Chemosphere*, V. 75, n°7, (May 2009), 878–882.
91. Emilio. L., Ghisalberti. M., Pennacchio. M., Alexander. E., “Survey of secondary Plant Metabolites with Cardiovascular Activity.”, *Pharmaceutical Biology*, V. 36, n° 4, (1998), 237-279.
92. Erkan. N., Ayranci. G., Ayranci E., “ Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. ”, *Food Chemistry*, V.110, Issue 1, (September 2008), 76–82.

93. Ernst.E., Pitter. M-H., Stevinson.C., White.A., Eisenberg. D., Marbouty. J-M.,
 “ Medecines alternatives : Le guide critique”, Elsevier masson, Royaume-Uni, (2005),
 504 p, p : 181.
94. Exarchou. V., Nenadis. N., Tsimidou. M., Gerothanassis. I. P., Troganis. A.,
 Boskou. D., “Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from greek
 Oregano, Greek Sage and summer savory. “, Journal of agricultural and food chemistry
 , V.50, n° 19, (August 2002), 5294-5299.
95. Faleiro. M.L., Miguel. M.G., Ladeiro. F., Venâncio. F., Tavares. R., Brito. J.C.,
 Figueiredo .A.C., Barroso. J. G., Pedro. L. G., “ Antimicrobial activity of essential oils
 isolated from Portuguese endemic species of Thymus”, Letters in Applied Microbiology,
 V. 36, Issue 1, (December 2002), 35–40.
96. Farmacopea Ufficiale Della, Neuvième édition, V.1, Italiana, (1972), 589 p,
 378.
97. Faure. H., Fayol. V., Galabert. C., Grolier. P., Le Moël. G., Steghens. J.-P.,
 Van Kappel. A., Nabet. F., “Les caroténoïdes : 1. Métabolisme et physiologie.”,
 Annales de Biologie Clinique, Revues générales, V.57, n°2, (Mars – Avril 1999), 169-
 83.
98. Favier. A., “ Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la
 compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. ”, L'actualité
 chimique, (2003), 108-115.
99. Fintelman V.F. et Weiss R.F., “ Manuel pratique de phytothérapie.”, Vigot,
 France, (2004).
100. Garreta. R., “ Des simples à l'essentiel : De l'herboristerie à l'aromathérapie,
 pratiques et représentations des plantes médicinales. “, Les anthropologiques, Presses
 Universitaires du Mirail, Toulouse, (2007), 359 p, p : 310.
101. GerhardVogel. H., Jakob Hock. F., Maas. J.,Mayer. D., “Drug Discovery and
 Evaluation Safety and Pharmacokinetic Assays. “, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
 New York, (2006), 889 p, p : 376, 377.
102. Ghestem. A., Seguin.E., Paris.A., Orecchioni. A-M., “Le préparateur en
 pharmacie: Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie-Homéopathie. Dossier 2”,
 TECH & DOC, paris, (2001), 273 p, 100-194.
103. Gilani. A. H., Mehmooda. M.H., Janbaz. K.H., Khan. A-U., Saeed. S. A.,
 “ Ethnopharmacological studies on antispasmodic and antiplatelet activities of Ficus
 carica. ”, Journal of Ethnopharmacology, V. 119, n° 1, (September 2008), 1–5.

104. Gilani.A. H., Shah. A. J., Zubair.A., Khalid. S., Kiani. J., Ahmed. A., Rasheed. M., Ahmad. V. U., “ chemical composition and mechanisms underlying the spasmolytic and bronchodilatory properties of the essential oil of *Nepeta cataria* L. ”, *Journal of ethnopharmacology*, V.121, Issue 3, (January 2009), 405-411.
105. Giordani. R., Kaloustian. J., “ Action anticandidosique des huiles essentielles: leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. ”, *Phytopharmacologie, Phytothérapie*, (2006), n° 3, 121-124.
106. Godfraind. T., Miller. R., Wibbo. M., “ Calcium antagonism and calcium antry blockade.”, *Pharmacology research*, V.38, (1986), 324.
107. Gotit. N., “ Standardisation des endotoxines de contrôle par rapport aux endotoxines de références dans le test LAL. ”, Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme des études universitaires spécialisées en biologie, Université SAAD Dahleb de Blida, (2005), 53 p.
108. Grout. M., “ Les analyses industrielles, Application aux gaz et liquides. ”, Hermès Science Publication, Paris, (2000), 320p, 62-146.
109. Gruenwald. J., Brendler. T., Jaenicke. C., “ PDR for herbal medicines. ”, Medical Economics company, Inc, Montreal, (2000), 858 p, 761.
110. Guignard J. L.,” Abrégé de biochimie végétal.” Deuxième édition, Masson, Paris, (1979).
111. Guignard. J-L., Dupont.F., Pelt.J-M. “ Collection abrégés de botanique : Systématique moléculaire. ”, masson, Treizième édition, Paris, (2004), 284 p, 234-237.
112. Guiraud. J-P., “ Technique et ingénierie : Microbiologie Alimentaire. ”, Série Agro-alimentaire, DUNOD, Paris, 1998, 652 p, 76 -576.
113. Habtemariam. S., Gray. A. I., Waterman. P. G., “A new antibacterial sesquiterpene from *Premna oligotricha*. “, *Journal of Natural Products*, V.56, (1993), 140–143.
114. Hale A. L., “Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating russet norkotah strains using aflp and microsatellite marker analysis.”, Thèse de doctorat, Texas University, (2003), 245 p.
115. Hammer. K.A., Carson. C.F., Riley. T.V., “Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts.”, *Journal of Applied Microbioogy*, V.86, Issue 6, (February 1999), 985–990.
116. Harborne. J. B., Baxter. H., “ Phytochemical Dictionary : A Handbook of bioactive Compounds from Plants. ”, Taylor & Frost, London, (1983), 791 p.

117. Harrigan. G. G., Ahmad. A., Baj. N., Glass. T. E., Gunatilaka. A. A. L., Kingston. D. G. I., "Bioactive and other sesquiterpenoids from *Porella cordeana*. ", *Journal of Natural Products*, V.56, (1993), 921–925.
118. Hartmann. I. W., "Basil and its health effects. ", *medicinal plants and therapy*, V.34, n° 8, (2007), 5p.
119. Haslam. E., "Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. ", *Journal of Natural Products*, V.59, (1996), 205–215.
120. Hayouni, E. A., Abedrabba. M., Bouix. M., Hamdi, M., "The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. ", *Food Chemistry*, V.105, (2007), 1126-1134.
121. Hedhili. L., Romdhane. M., Abderrabba. M., " Extraction de l'huile essentielle de Thym (*Thymus capitatus*) : Etude qualitative et quantitative de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation et entraînement à la vapeur.", *Revue des régions arides*, (2007), V.1, 7 p, 60-66.
122. Hess .S. M., "Salon Ovarions' Guide to Aromatherapy. ", Milady Publishing Company, New York, USA, (1996), 207p, 7, 8.
123. Hijri. M., " *Phytopathologie : Les champignons phytopathogènes.*", Partie 2, cour 5, Faculté des arts et des sciences, Département des sciences biologiques, Université de Montréal, (2007), 79 p, 8- 19.
124. Hijri. M., " *Protozoaires phytopathogènes : Les champignons phytopathogènes.*", Partie 1, Cour 5, Faculté des arts et des sciences, Département des sciences biologiques, Université de Montréal, (2007), 78 p,
125. Himejima. M., Hobson. K. R., Otsuka. T., Wood. D. L., Kubo. I., "Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: a defense mechanism against microbial invasion. ", *Journal of Chemistry and Ecology*, V.18, (1992), 1809–1818.
126. Hirasa. K., Takemasa. M., " Spice Science and Technology, Food science and technology. ", V.89, CRC Press, Taylor & Francis Group, Tokyo, Japan, (1998), 219 p.
127. Hodge H.C. Sterner J.H. " Determination of substances acute toxicity by LD50. ", *American Industrial Hygiene Association*, V. 10, (1949), 93p, 4.
128. Hodgson. E., " A textbook of modern toxicology. ", John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey and Canada, troisième édition, (2005), 557 p, 63-218.

129. Iqbal .A., Farrukh .A., Owais .M., “Modern Phytomedicine:Turning Medicinal Plants into Drugs. “,WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,Weinheim, Germany, (2006), 384p, 21-166.
130. Iserin. P., Masson. M ., Restellini. J-P., Ybert. E., de La Roque. R., Vican. P., Ybert. E., “Larousse Encyclopédie des plantes medicinales. Identification, préparations, soins”, Larousse / VUEF, paris, (2001), 335 p, pp : 8- 143.
131. Ismailia. H., Milellab. L., Fkih-Tetouanic. S., Ilidrissic. A., Camporesed. A., Sosae. S., Altiniere. G., Della Loggiae. R.,Aquino. R., “ In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of Thymus satureioides leaves. ”, Journal of Ethnopharmacology, V.91, Issue 1, (2004), 31-36.
132. Ivan A. R., “ Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. ”, V.3, Humana Press Inc, New Jersey, (2005), 623p.
133. Jackson. B.P., Snowdon. D. W., “ Atlas of microscopy of medicinal plants, Culinary herbs and spices. ”, Belhaven press, London, (1990), 257 p, 234- 235.
134. Jeffery. B., Harborne. A., Baxter. H., “ A Handbook of Bioactive Compounds from Plants : Phytochemical Dictionary”, Taylor & Frost, London, (1983), 791 p.
135. Jordan. M.J., Martinez. R.M., Cases. M.A., Sotomayor. J.A., “ Watering Level Effect on Thymus hyemalis Lange Essential Oil Yield and Composition. ”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, V. 51, n°18, (July 2003), 5420–5427.
136. Juhas. S., Bujnakova. D., Rehak. P., Cikos. S., Czikkova. S., Vesela. J., Ilkova. G., Koppel. J., “ Anti-Inflammatory Effects of Thyme Essential Oil in Mice ”, ACTA VET. BRNO, V.77, (2008), 327–334.
137. Juliano. C., Mattana. A., Usai. M., “ Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of Thymus berba-barona Loisel growing wild in Sardinia. ”, Journal of Essential Oil Research, V.12, Issue 4, (2000), 516–522.
138. Justesen. U., Knuthsen. P., “ Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoids intake by use of herbs in traditional Danish dishes.”, Journal of food Chemistry, V.73, (2001), 245- 250.
139. Kaliste. E., “The Welfare of Laboratory Animals. ”, V.2, Springer, The Netherlands, (2007), 345 p, 119-237.
140. Kamatou. G.P.P., Viljoen. A.M., Gono-Bwalya. A.B., van Zyl. R.L., Van Vuuren. S.F., Lourens. A.C.U. , Başer. K.H.C., Demirci. B., Lindsey. K.L., Van Staden. J., Steenkamp. P., “ The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African Salvia species. ”, Journal of Ethnopharmacology, V.102, Issue 3, (December 2005), 382-390.

141. Katalinic. V., Milos. M., Kulisic. T., Jukic. M., “ Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. ”, Journal of Food Chemistry, V. 94, (2006), 550–557.
142. Katsube. T., Tabata. H., Ohta. Y., Yamasaki. Y., Anuurad. E., Shiwaku. K., “ Screening for antioxidant activity in edible plant products: Comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin–Ciocalteu assay. ”, Journal of the Agricultural and Food Chemistry, V.52, (2004), 2391–2396.
143. Keeler. R.F., Tu. A.T., “ Toxicology of Plant and Fungal Compounds : Handbook of Natural Toxins. ”, V. 6, Marcel Dekker, Inc, New York, (1991), 665 p.
144. Keville. K., Green. M., “Aromatherapy: a complete guide to the healing art.”, The Crossing Press, (1995), 156 p, p : 9.
145. Khare. C. P., “Indian medicinal plants, An illustrated dictionary with 215 pictures of crude herbs. ”, Springer science and Business media, LLC, USA, (2007), 739 p, 660, 661.
146. Kordali.S., Kotan. R., Mavi. A., Cakir. A., Ala. A., Yildirim.A., “ Determination of the chemical composition and antioxydant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus,A. santonicum and A. spicigera essential oils. ”, Journal of agriculture and food chemistry, V.53, (2005), 9452-9458.
147. Krinke. G. J., “ The handbook of experimental animals: The laboratory rat. ”, HP edition, USA, (2000), 756 p, 4.
148. Kubo. I., Muroi. H., Himejima. M., “Antibacterial activity of totarol and its potentiation. ”, Journal of Natural Products, V.55, (1992), 1436–1440.
149. Kubo. I., Muroi. H., Himejima. M., “Combination effects of antifungal nagilactones against Candida albicans and two other fungi with phenylpropanoids. ”, Journal of Natural Products, V.56, (1993), 220–226.
150. Kumar A., Shukla. R., Singh. P., Prasad. C. S., Dubey. N. K. “ Assessment of Thymus vulgaris L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. ”, Innovative Food Science and Emerging Technologies, V. 9, (2008), 575–580.
151. Laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (L.N.C.P.P), “ Techniques de contrôle pharmacologique des produits pharmaceutiques.”, Document interne, Alger, (2000), 29 p, 17- 29.
152. Lahlou. M., “ Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. ”, Phytotherapy Research, V. 18, (2004), 435-448.

153. Lawrence. B.M., " Essential Oils : Three annual compilations on essential oils. ", 1977-1980, in Duke. J. A. " Writeups or information summaries on approximately 2000 economic plants. ", United states département of agricultur , Beltsville.
154. Lebreton. P., Jay. M., Voirin. B., " L'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes.", *Chimie analytique*, (1967), 375- 383.
155. Leung. A. Y., Foster. S "Encyclopedia of Common Natural Ingredients. ", John Wiley & Sons, deuxième édition, New York , (1995), 649 p.
156. Levy. L., "Carrageenan paw oedema in the mouse. ", *Life Sciences* , 8, (1969), 601–606.
157. Lis-Balchin. M., "Lavender The genus Lavandula. ", Taylor & Francis, London and New York, (2002), 268 p, 124-130.
158. List. P.H., Horhammer, L., "Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. ", V. 2-6, Springer-Verlag, Berlin, (1969-1979).
159. Lopez-Ayerra. B., Antonia Murcia. M., Garcia-Carmona. F., "Lipid peroxidation and chlorophyll levels in spinach during refrigerated storage and after industrial processing.", *Food Chemistry*, V.61, n° 2, (1998), 113-118.
160. Loziené. K., Venskutonis. P. R., Sipailiene. A., uozas Labokas. J., "Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. ", *Journal of Food Chemistry*, V.103, Issue 2, (2007), 546–559.
161. Lucchesi. M. E., "Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. ", Thèse de doctorat en sciences, Discipline : Chimie, Université de la reunion, Faculté des Sciences et Technologies, Canada, (2005), 143 p.
162. Luque-Garcia. J.L., Luque de Castro. M.D., "Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. ", *Journal of Chromatography A*, V. 1034, Issues : 1-2, (April 2004), 237-242.
163. Marculescu. A. , Vlase. L., Hanganu. D., Dragulescu. C., Antonie. I., Neli-Kinga. O., "Polyphenols analyses from *Thymus* species. ", *Proc. Rom. Acad., Series B*, V. 3, (2007), 117–121.
164. Marshall. A.G., Hendrickson. C.L., "Fourier transform ion cyclotron resonance detection: Principles and experimental configurations. ", *International Journal of Mass spectrometry*, V. 215, (2002), 59- 75.

165. Mata A.T., Proença C. , Ferreira A.R., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F., Araujo M.E.M., “Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices.”, *Food Chemistry*, V.103, n° 3, (2007), 778–786.
166. Matosiuk. D, Wolski. T., Sarachman-Gozdziuk. K., “Compounds of natural origin with analgesic and anti-inflammatory activity. Part 1. Arachidonic acid metabolic pathway inhibitors”,V.XX, n 2, 5, (2007), 45-52.
167. Mendoza. L., Wilkens. M., Urzua. A., “Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). ”, *Journal of Ethnopharmacology*, V.58, (1997), 85–88.
168. Mengal. P., Behn. D., Bellido Gil. M., Monpon. B., “ VMHD : extractio d'huile essentielle par micro-ondes ”, *Parfums, Cosmétiques et Aromes*, V. 114, (1993), 66-67.
169. Merck. S. A., “ Chimie de spécialité, produits chimiques et réactifs.”, Merck, Paris, (2002), 1280 p, 59, 879.
170. Meyer S., Reeb C. et Bosdeveux, “ Botanique : Biologie et physiologie végétale collection sciences fondamentales. ”, Maloine, Paris, (2004).
171. Meyer. A., Deiana. J., Leclerc. H., “Cours de microbiologie générale.”, Doin, (1988), 177-178.
172. Miguel M.G., Figueiredo A.C., Costa M.M., Martins D., Duarte J., Barroso J.G. , “ Effect of the volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *T. Mastichina*, *T. carnosus* and *Thymbra capitata* in sunflower oil. “, *Nahrung Food*, V.47, Issue 6, (2003), 397–402.
173. Miguel. G., Simoes. M., Figueiredo.A.C., Barroso. J.G., Pedro L.G., Carvalho. L., “ Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. “, *Journal of Food Chemistry*, V.86, Issue 2, (June 2004), 183–188.
174. Miliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek T.A., “ Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts.”, *Food Chemistry*, 85, Issue 2, (April 2004), 231–237.
175. Mishra.A.K., Dubey. N.K., “Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities.”, *Journal of applied and Environnemental Microbiology*, (April 1994), 1101 – 1105.
176. Miura. K. and Nakatani. N., “ Antioxidative activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L.). ”, *Agriculture Biology and Chemistry*, V.53, (1989), 3043–3045.

177. Munoz-Bertomeu. J., Arrillaga. I., Ros. R., and Segura. J., "Up-Regulation of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase Enhances Production of Essential Oils in Transgenic Spike Lavender1.", *Plant Physiology*, V.142, (2006), 890–900.
178. Murphy Cowan. M. " Plant products as antimicrobial agents. ", *Clinical Microbiology Reviews*, American Society for microbiology, V. 12, n° 4, (October 1999), 564-582.
179. National Institute of Health (NIH) et Directive 86/609 CEE, publication n° 86-23 révision, USA, (1985).
180. Négué Diarra. M., " Etude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali : *Spilanthes oleracea* Jacq. (Asteraceae)", Université de BAMAKO, Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie, Mali, Thèse de Doctorat d'état en Pharmacie, (2003), 78 p, 42- 48.
181. Newall. C. A., Anderson. L. A., Phillipson. J. D., "Herbal Medicine : A Guide for Health-care Professionals.", The Pharmaceutical Press, London, (1996), 296 p.
182. Nijveldt. R. J, van Nood. E., van Hoorn. D. E.C., Boelens. P. G., van Norren. K., van Leeuwen P. A. M., " Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications.", *American Journal of Clinical Nutrition*, V.74, (2001), 418–25.
183. O'Hare. S., Atterwill. C.K., "Methods in molecular biology: In vitro toxicity testing protocols. ", V. 43, Humana press INC, Totowa - New Jersey, (1995), 326 p, 29,30,31.
184. Oktay M., Gulcin I., Irfan Kufrevioglu O., "Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. ", *Lebensm.-Wiss. U.-Technol*, V. V.36, (2003), 263–271.
185. Osawa. K., YasudaHiroshi. M. H., Takeya. K., Itokawa. H., " Macrocarpals H, I, and J from the Leaves of *Eucalyptus globulus*. ", *journal of natural products*, V.59, Issue 9, (September 1996), 823-912.
186. Oussalah M., Caillet. S., Saucier. L., Lacroix. M., " Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. ", *Food Control*, V.18, n° 5, (2007), 414-420.
187. Öztürk. A., Özbek. H., " The anti-inflammatory activity of *Eugenia caryophyllata* essential oil : An animal model of anti-inflammatory activity. ", *European Journal of Genetique and Medecin*, V. 2, n° 4, (2005), 159-163.

188. Panizzi. L., Flamini. G., Cioni. L., Morelli. I., “ Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae”, Journal of ethno pharmacology , V. 39, Issue : 3, (August 1993), 167- 170.
189. Périneau. F., Ziouani. H., Delmas. M., Gaset. A., Lévy. G., “ Huile essentielle de Céleri – Turbo-extraction industrielle. ”, Parfums, Cosmétiques et Arômes, n° 90, (1990), 85-92.
190. Pessoa. L.M., Morais. S.M., Bevilaqua. C.M.L., Luciano. J.H.S., “ Anthelmintic activity of essential oil of ocimum gratissimum Linn. And eugenol against Haemonchus contortus. ”, Journal of veterinary parasitology, V. 109, Issues :1-2, (October 2002), 59-63.
191. Pesson. P. , Louveaux .J. “ Pollinisation et productions végétales. ”, QUAE, paris, (1984), 625 p, 35.
192. Peter K. V., “Handbook of herbs and spices.”, V.2, Woodhead Publishing Ltd, England, (2004), 365p, 309- 329.
193. “Pharmacopée européenne.”, Direction de la qualité du médicament du conseil d’Europe (DEQM), troisième édition, Série des traités européens n° 50, Strasbourg France, (1997), 1- 1912, 16, 17, 44, 865.
194. “Pharmacopée européenne.”, Direction de la qualité du médicament du conseil d’Europe (DEQM), troisième addendum de la troisième édition, Série des traités européens n° 50, Strasbourg France, (2001).
195. “Pharmacopée européenne.”, Direction de la qualité du médicament du conseil d’Europe (DEQM), Cinquième édition, Tome 1, Série des Traités européens n° 50, Strasbourg France, (2005), 1- 955, 28, 235.
196. “Pharmacopée européenne.”, Direction de la qualité du médicament d conseil d’Europe (DEQM), Cinquième édition, Tome 2, Série des Traités européens n° 50, Strasbourg France, (2005), 967- 2976, 2600, 2777, 2778, 2779, 2780.
197. “Pharmacopée européenne.”, Direction de la qualité du médicament du conseil d’Europe (DEQM), Cinquième édition, Série des Traités européens n° 50, Strasbourg France, (2007), 44 - 96.
198. “Pharmacopée européenne.”, Direction de la qualité du médicament du conseil d’Europe (DEQM), sixième édition, Tome 1, Strasbourg France, (2008), 1- 1147, 14 - 145.
199. Prabuseenivasan. S., Jayakumar. M., Ignacimuthu. S., “ In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. ”, BMC Complementary and Alternative Medicine, V.6, n°39, (November 2006), 1-8.

200. Price. S., Price. L., Pénéol. D. “ Aromatherapy for health professionals. ”, Elsevier Health Sciences, Second édition, London, (1999), 391 p, 10, 11, 12.
201. Priestley. C.M., Burgess. I. F., Williamson. E.M., “ Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus*, and its eggs. ”, *Journal of fitoterapia*, V. 77, issue : 4, (June 2006), 303-309.
202. Quezel. P., Santa. S., “ Nouvelle flore d’Algérie et des régions désertiques méridionales. ”, Tome II, Centre National de la Recherche Scientifique(CNRS), Paris 7 France, (1963), 1170 p, 804- 807.
203. Rahman.A-U., Choudhary. M.I., Thomson.W.J. ” Bioassay techniques for drug development. ”, Taylor & Francis , Amsterdam, (2005), 203 p, 12- 94.
204. Rajnayana. K., Sripal Reddy. M., Chaluvadi. M.R., Krishna. D.R., “Bioflavonoids classification, Pharmacological, Biochemical effects and therapeutic potential. ”, *Indian Journal of Pharmacology* , V.33, (2001), 2-16.
205. Raju. M., Varakumar. S., Lakshminarayana. R., Rishnakantha. T. P., Baskaran. V., “ Carotenoid composition and vitamin A activity of medicinally important green leafy vegetables. ”, *Food Chemistry*, V.101, (2007), 1598–1605.
206. Ramawat .K .G., Merillon . J-M. “Bioactive Molecules and Medicinal Plants.”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, German, (2008), 379 p, 326, 106.
207. Rana. B. K., Singh. U. P., Taneja. V., “Antifungal activity and kinetics of Inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. “, *Journal of Ethnopharmacology*, V.57, (1997), 29–34.
208. Rana. B. K., Sreeramulu. K., Gunasekar. D., Ramesh. D. “Two new sesquiterpene lactones from *Ceiba pentandra*. “, *Journal of Natural Products*, (1993), V.56, 2041–2045.
209. Randerath. K., “ Chromatographie sur couche mince.”, Gauthia- Villars, Paris,c(1971), 337- 339.
210. Ratty. K., Das. N. P., “Effects of Flavonoids on Nonenzymatic Lipid Peroxidation: Structure-Activity Relationship.”, *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, V.39, (1988), 69-79.
211. Razzaghi-Abyaneh. M, Shams-Ghahfarokhi. M., Rezaee. M-B., Jaimand. K., Alinezhad. S., Saberi. R., Yoshinari. T., “ Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. ”, *Food Control* , 20, (2009) , 1018–1024.

212. Regnault-Roger. C., Ribodeau. M., Hamraoui. A., Bareau. I., Blanchard. P., Gil-Munoz. M-I., Barberan. F. T., “ Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). ”, *Journal of Stored Products Research*, V.40, Issue 4, (2004), 395- 408.
213. Reiter. M., Brandt. W, “Relaxant effect on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. ”, *Arzneim- Forsch*, V.35, (1985), 408 – 414.
214. René Revuz. J.E., “ Traité EMC : Cosmétologie et dermatologie esthétique.”, elsevier masson, section E, paris, (2009), 500 p, 2,3.
215. Rinzler, C. A., “ The Complete Book of Herbs, Spices and Condiments. ”, Facts on File, New York, (1990), 199 pp.
216. Rizk. A. M., ” Constituents of plants growing Qatar.”, *Fitoterapia*, V.52, n° 2, (1982), 35 -42.
217. Rodrigez-Amaya. D.B., “A guide to carotenoid analysis in food.”, University Estadual de Campinas, Brazil, (1997), p64.
218. Rouatbi. M., Duquenoy. A., Giampaoli. P., “Extraction of the essential oil of thyme and black pepper by superheated steam. ”, *Journal of Food Engineering*, V. 78, issue : 2, (January 2007), 708–714.
219. Rubin.M , Messalin. J-P., “ Guide pratique de phytothérapie et d'Homéopathie. ”, ellipes marketing, (1990).
220. Safaei-Ghomia. J., Ebrahimabadia. A. H., Djafari-Bidgolia. Z., Batoolib. H., “Analytical Methods GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. ”, *Journal of Food Chemistry*, V.115, Issue 4, 15, (2009), 1524-1528.
221. Sallé. J- L., Pelletier. J. “ Les huiles essentielles : Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. ”, Frison-Roche, Paris, (1991), 163 p, 16- 49.
222. Salvador.A., Chisvert.A., “ Analysis of cosmetic products. ”, Elsevier science, Amsterdam, (2007), 502 p, 355-358.
223. Sarker. S. D., Nahar. L., “ Chemistry for Pharmacy Students General, Organic and Natural Product Chemistry. ”, John Wiley & Sons Ltd, England, (2007), 383 p, 302-369
224. Sass-Kis A., Kiss J., Milotay P., Kerek M.M., Toth-Markus M., “Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. ”, *Food Research International*, V. 38, (2005), 1023–1029.
225. Sato. M., Fujiwara. S., Tsuchiya. H., Fujii. T., Iinuma. M., Tosa. H., Ohkawa. Y., “Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. ”, *Journal of Ethnopharmacology*, V.54, (1996), 171–176.

226. Schnitzler. A.C., Nolan. L.L., Labre. R., " Screening of medicinal plants for antileishmanial and antimicrobial activity. ", *Acta Horticulturae: International Society for Horticultural Science*, V.426, (1996), 235–41.
227. Schnitzler. P., Koch. C., Reichling. J., " Susceptibility of Drug-Resistant Clinical Herpes Simplex Virus Type 1 Strains to Essential Oils of Ginger, Thyme, Hyssop, and Sandalwood " , *American Society for Microbiology, Antimicrobial agents and chemotherapy*, V. 51, n° 5, (May 2007), 1859–1862.
228. Scimeca. D., Tétou. M. " Votre santé par les huiles essentielles Par les huiles essentielles : Le guide pratique pour prévenir et guérir tous les maux quotidiens. ", Alpen s.a.m., Paris , (2005), 94 p, 12, 13.
229. Scortichini. M., Pia Rossi. M., "Preliminary in vitro evaluation of the Antimicrobial activity of terpenes and terpenoids towards *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. ", *Journal of Applied Bacteriology*, V.71, (1991), 109–112.
230. Sell. C- S., " Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry. ", *The Royal Society of Chemistry* , Cambridge, (2003), 410 p , 2-340.
231. Siouffi. A. M., Dauphin. C., Pradeau. D., "Chromatographie planaire.", *Parie 1* : 473, *Techniques de l'ingénieur*, (1990), 20 p, 2.
232. Skoog. A.D., West. M.D., Holler. J.F., " Chimie analytique. ", De Boech et Larcier S.A., septième édition, Bruxelles, (1997), 870 p, 561-562.
233. Socaci. S.A., Tofana. M., Socaciu. C., " GC-MS Analysis of Rosemary Essential oil. ", *Bulletin UASVM, Agriculture*, V.65, n°2, (2008), 405- 409.
234. Sokmen, M. Gulluce, H.A. Akpulat, D. Daferera, B. Tepe and M. Polissiou , " The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*.", *Journal of Food Control*, V.15, Issue8, (2004), 627–634.
235. Sokovic. M., van Griensven. L.J.L.D., " Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. ", *European Journal of Plant Pathology*, V.116, n° 3, (November 2006), 211–224.
236. Soto-Mendivil. E.A., Moreno-Rodriguez. J.F., Estarron-Espinosa.M., Garcia-Fajardo. J.A, Obledo-Vasquez. N.O., "Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. ", *Rvue of science and technology e-Gnosis*, V. 4, Article: 16, (Novembre 2006), 7 p.
237. Speranza. A., Calzoni. G-L., " Atlas de structure des plantes : Guide de l'anatomie microscopique des plantes vasculaires en 285 photos. ", Belin, Paris cedex, (2005), 224 p, 119, 218.

238. Stahl-Biskup .E. , Sáez . F. “ Thyme : The genus Thymus. “, Taylor & Francis, USA and Canada, (2002), 330 p.
239. Stelljes. M.E., “Toxicology for Nontoxicologists. ”, Government Institutes : an imprint of The Scarecrow Press, Inc., United States of America, (2008), 207 p, 61-63.
240. Stern. J. L., Hagerman. A. E., Steinberg. P. D., and Mason. P. K., “Phlorotannin- protein interactions. ”, Journal of Chemistry and Ecology, V.22, (1996), 1887–1899.
241. Suckow. M.A., Danneman.P., Brayton.C., “ The laboratory mouse. ”, CRC Press LLC, USA, (2001), 168 p, 1- 26.
242. Suresh. B., Sriram. S., Dhanaraj. S. A., Elango. K., Chinnaswamy. K., “Anticandidal activity of Santolina chamaecyparissus volatile oil. ”, Journal of Ethnopharmacology, V.55, (1997), 151–159.
243. Svoboda. K- P., Svoboda .T. G. “ Secretory structures of aromatic and medicinal plants a review and atlas of micrographs. ”, Microscopix publications, British library, (2000), 60 p, 7- 41.
244. Svobodová. A., Psotová. J., Walterová. D., “Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage.”, Biomed. Papers, V.147, n° 2, (2001), 137–145.
245. Sylvestre. M., Pichette. A., Longtin. A., Nagau. F.Legault. F., ” Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of Croton flavens L. from Guadeloupe. ”, Journal of ethnopharmacology, V. 103, (2006), 99-102.
246. Tassou. C. C., Drosinos E. H., Nychas. G. J. E., “Effects of essential oil from mint (Mentha piperita) on Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes in model food systems at 4° and 10°C. “, Journal of Applied Bacteriology, V.78, (1995), 593–600.
247. Tawaha K., Alali F. Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-Elimat T., “Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. “, Food Chemistry, V.104, (2007), 1372–13783.
248. Taylor. R. S. L., Edel. F., Manandhar. N. P., Towers. G. H. N., “Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. “, Journal of Ethnopharmacology, V.50, (1996), 97–102.
249. Tepe. B., Donmez. E., Unlu. M., Candan. F., Daferera. D., Vardar-Unlu. G., Polissiou. M., Sokmen. A., “ Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of Salvia cryptantha (Montbret et Aucher ex Benth.) and Salvia multicaulis (Vahl).”, Food Chemistry, V.84, n° 4, (2004), 519-525.

250. Tepe. B., Sokmen. M., Akpulat. H.A., Daferera. D., Polissiou. M., Sokmen .A., “ Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp *Sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. “, *Journal of Food Engineering* , V.66, Issue 44, (2005), 447–454.
251. Ternes. W., Gronemeyer. M. , Schwarz. K., “ Determination of p-cymene-2,3-diol, thymol, and carvacrol in different foodstuffs.”, *Zeitschriftfur Lebensm Unters Forsch*, V.201, (1995), 544-547.
252. Teuscher .E. , Anton .R. , Lobstein .A., “ Les plantes aromatiques : Epices, aromates condiments et huiles essentielles. ”, Lavoisier, technique et documentation, (2005), 519 P, 3 – 480.
253. Thun. M., “ Les plantes médicinales, leur utilisation pour la santé de l'homme et des plantes. ”, Mouvement de culture Bio-dynamique , France, (1998), 175 p.
254. Trabut. B., “ Flore analytique et synoptique de l'Algérie et de la Tunisie. ”, Franceschi, Alger, (190)2, 460 p, 258-259.
255. Tranchant. J., “ Chromatographie en phase gazeuse.”, Partie 1 : 485, Techniques de l'ingénieur, Traité analyse et caractérisation, (1969), 7p, 2, 3.
256. Tsuchiya. H., Sato. M., Miyazaki. T., Fujiwara. S., Tanigaki. S., Ohyama.M., Tanaka. T., Iinuma. M., “Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.”, *Journal of Ethnopharmacology*, V.50, (1996), 27–34.
257. Van Den Broucke. C. O., Lemli. J.A., “ Pharmacological and chemical Investigation of thyme liquid extracts.”, *Planta Medicinal*, V.41, (1981), 129–135.
258. Van Den Broucke. C.O., “ The therapeutic value of *Thymus* species. ”, *Fitoterapia*, V.4, (1983), 171–174.
259. Van Den Broucke1. C. O., Lemli. J. A. , “Spasmolytic activity of the flavonoids from *Thymus vulgaris*.”, *revue de Pharmacy World & Science*, V.5, Number 1, (February 1983), 9-14.
260. Wagner. H., Wierer. M., “ In- vitro hemmung der prostaglandinbiosynthese durch ätherische öle, phenolische verbindungen und knoblauchinhaltsstoffe.”, *Journal of phytotherapy*, V.9, (1987), 11 – 13.
261. Waksmundzka-Hajnos. M., Sherma. J., Kowalska. T., “Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. “, Taylor & Francis Group, LLC, CRC Press, Boca Raton London New York, (2008), 874 p, 185- 200.

262. Wang. M., Li. J., Ho. G.S., Peng. X., Ho. C-T., “ Isolation and identification of antioxidative flavonoid glycosides from thyme (*Thymus vulgaris* L.). ”, *Journal of Food Lipids*, V.5, (1998), 313–21.
263. Wengell. D., Gabriel. N., “Educational opportunities in integrative medicine. ”, Douglas “Las” wengell - Hunter press, USA, (2008), 291 p, 149.
264. Wishaw. I.Q., Kolb. B., “ The Behavior of the Laboratory Rat, A Handbook With Tests.”, Oxford university press Inc, Oxford New York, USA, (2005), 504 p, 3-324.
265. Wiart. C., “ Medicinal plants of the Asia- Pacific : Drugs for the future . ”, Wold scientific publishing CO. Pte. Ltd., London- USA, (2006), 719 p, 519.
266. Wichtl. M. et Anton R., “ plantes thérapeutiques. Traditions, pratique officinale, science et thérapeutiques. ”, Lavoisier technique et documentation (Tec et Doc) & Médicales internationales (EM inter), 2^{ème} édition, Paris Cedex, (2003), 692 p, 18-31.
267. Willem. J. P., “ Les huiles essentielles, médecine d’avenir.”, Dauphin, Troisième édition, Paris, (2004), 318 P.
268. Wojdyłoa. A., Oszmiańska. J., Czemyers. R., “ Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs . ”, *Journal of food Chemistry*, V.105, Issue 3, (2007), 940-949.
269. Wolfensohn. S., Lloyd. M., “Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare.”, Blackwell Publishing Ltd, troisième édition, USA, (2003), 416 p, 233-290.
270. Wong S. P., Leong L. P., Koh J. H. W., “ Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants.”, *Food Chemistry*, V.99, (2006), 775–783.
271. World Health Organization (WHO), “ Monographs on selected medicinal plants. ”, WHO, V.1, Geneve, (1999), 289 p, 262, 263.
272. Ya. C., Gaffney. S. H., Lilley. T. H., Haslam. E., “Carbohydratepolyphenol complexation, ”, In Hemingway R. W. et Karchesy J. J. “ Chemistry and significance of condensed tannins. ”, Plenum Press, New York, N.Y. (1988), 553.
273. Yang. H.X., Ng. T.B., “ Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. ”, mini review : *Life sciences*, V. 65, n° 25, (1999), 2663-2677.
274. Yang. Y-C., Lee.H-S., Lee.S-H., Marshall Clark.J., Joon Ahn.Y., “ Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura : Pediculidae). ”, *International Journal for Parasitology*, V.35, Issue 14, (December 2005), 1595-1600.

275. Yanishlieva-Manach. N. N., Heinonen. M., “ Sources of natural antioxidants. ”
In: Pokorny. J., Yanishlieva N. and Gordon M., “ Antioxidants in food”, CRC Press,
Boca Raton (2001), 210–249
276. Yilmaz. M., Gül. A., Erbasli. K., “Acute toxicity of alpha-cypermethrin to
guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859) ”, *Journal of Chemosphere*, V. 56, (2004),
381–385.
277. Zarzuelo. A., Cabo. M. M., Cruz. T., Jimenez. J., “ Spasmolytic action of
essential oil of *Thymus longiflorus* Boiss. In Rats.”, *Journal of Phytotherapy Research*,
V.3, (1989), 36- 39.
278. Zekovid. Z, Lepojevid. Z., Vujid. D., “ Supercritical Extraction of Thyme
(*Thymus vulgaris* L.) ”, *Chromatographia Journal* , V. 51, n° : 3-4, (February 2000),
175-180.
279. Zheng. W., Wang. S. Y., “Antioxidant activity and phenolic compounds in
selected herbs. “, *Journal of agricultural and food chemistry*, V.49, (2001), 5165- 5170.