

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

## UNIVERSITÉ BLIDA 1



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

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

### THEME

Valorisation de L'essence Aromatique du Thym  
(*Thymus vulgaris*L.) et de la Lavande  
(*Lavandulastoechas*L.) en Aromathérapie Anti-

Présenté par

M<sup>elle</sup> MALLAOUI Zineb.

M<sup>elle</sup> BAHLOULI Oum saad.

Date de Soutenance

21/09/2017

Devant le jury composé de :

M. ROUBI A.	MC	Université Blida 1	Président
M <sup>me</sup> BENASSEL N.	MAA	Université Blida 1	Examinatrice
M. Boukhatem M.N	MC	Université Blida 1	Promoteur

🌀 Promotion: 2016-2017 🌀

# *Remerciements*

En premier lieu et avant tout nous remercions DIEU « ALLAH » le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience et la force de réaliser ce projet de fin d'étude.

Nous tenons tout d'abord à exprimer nos profonds remerciements à notre promoteur monsieur **BOUKHATEM M.N.** pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous accordé nous a permet de réaliser ce travail.

Dans un deuxième temps, Nous remercions **M. TEFFAHI DJ.** Et **M<sup>me</sup> BENTARCHA** qui ont bien voulu nous aider par ces conseils pendant ce projet.

Nous adressons nos sincères remerciements à Monsieur **ROUIBI A.** d'avoir accepté de présider le jury Nous tenons à remercier **M<sup>me</sup> BENASSEL N.** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Nous tenons également à adresser nos vifs remerciements à l'ensemble du personnel du laboratoire d'hygiène de la wilaya de BLIDA service mycologie, et du Laboratoire de la station d'ADE (Algérienne des eaux) de l'unité de Blida (cheffa), et de Laboratoire d'Ibrahim Trichin (Fabour), service bactériologie.

Nous tenons aussi à remercier **M. HMIDA L.** et **M<sup>me</sup> BOUFRIDI A.** qui nous ont aidées dans notre projet. Nous remercions tous nos collègues et amis, pour les conseils, les services et plus particulièrement pour l'amitié qu'ils nous ont témoignées. Nous vous souhaitons à tous bonheur, réussite et tout le bien que vous méritez.

En terminant, nous souhaitons démontrer notre grande gratitude à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin et plus particulièrement à nos familles à la réalisation de ce projet.

*Merci à tous*

# *Dédicace*

*Je dédie le fruit de ce modeste travail*

*Comme un geste de gratitude*

*A mes chers parents*

*Pour leur sacrifice, leur amour, leur*

*Soutien et encouragements tout au*

*Long de mes études*

*A mes chers frères Brahim, Younes et Az-eddine, Sid ahmed*

*A mes chers membres de famille BAHLOULI et HADJ DJAB ALLAH*

*A tous les étudiants du Master II phytothérapie et santé*

*A tous les professeurs que ce soit primaire surtout Mme NECHNECH F.  
du moyen, du secondaire*

*ou de l'enseignement supérieur.*

**OUM SAAD**

# *Dédicace*

*Je dédie le fruit de ce modeste travail*

*Comme un geste de gratitude*

*A mes chers parents*

*Pour leur sacrifice, leur amour, leur*

*Soutien et encouragements tout au*

*Long de mes études*

*A mes chers frères Billal, Mohamed et Ahmed*

*A mes très chères soeurs Habiba et Khalida*

*A mes membres de famille de MALLAOUI et TIGHARSI*

*A tous les étudiants du Master II*

*Phytothérapie et santé*

*A tous les professeurs que ce soit du*

*Primaire, du moyen, du secondaire*

*ou de l'enseignement supérieur*

*Zineb*

# Liste des Abréviations

---

- ADE : Algérienne des eaux.
- AFNOR : Association Française de Normalisation.
- AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments et des Produits de Santé.
- ATB : Antibiotique.
- ATB : Antibiotiques.
- ATCC: American Type Culture Collection.
- ATF : Antifongique.
- CG-SM : Chromatographie Gazeuse-Spectromètre de Masse.
- CMB : Concentration Minimale Bactéricide.
- CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.
- DZI : Diamètre de Zone d’Inhibition.
- EPH : Etablissement Public Hospitalier.
- EVE : Entraînement à la Vapeur d’Eau.
- FID : Flamme Ionisation Detector.
- GEN : Gentamicine.
- GN : Gélose Nutritive.
- HE : Huile Essentielle.
- HE : Huile essentielle.
- HEX : Hexamidine.
- IK : Indice de Kovats.
- Ir : Indice de Rétention.
- ISO : International Organisation for Standardisation.
- MH : Muller-Hinton.
- NaCl : Chlorure de sodium.
- NF : Norme Française.
- PA : Principe Actif.
- PAM : Plantes Aromatique et Médicinale.
- ® : Marque enregistrée.
- R : Résistant.
- S : Sensible.
- SAB : Sabouraud additionné de Chloramphénicol.
- SIN : Système International.
- TR : Temps de Rétention

# Liste des Tableaux

---

Tableau 2.1. Souches bactériennes utilisées pour le screening antibactériennes huiles essentielles de <i>Lavandula stoechas</i> et <i>Thymus vulgaris</i> .	11
Tableau 2.2. Souches utilisées pour le screening antifongique des huiles essentielles de <i>Lavandula stoechas</i> et <i>Thymus vulgaris</i> .	12
Tableau 3.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> distillée, à échelle industrielle, par entrainement à la vapeur d'eau sous pression.	18
Tableau 3.2. Principaux composés dans l'essence de <i>T. vulgaris</i> provenant de différents écosystèmes.	20
Tableau 3.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Lavandula stoechas</i> distillée, à échelle industrielle, par entrainement à la vapeur sous pression.	22
Tableau 3.3. Composés chimiques majoritaires détectés dans l'essence des lavandes papillonsprovenant de différentes localisations géographiques.	24
Tableau 3.4. Screening antibactérien <i>in vitro</i> de l'essence de <i>Thymus vulgaris</i> .	26
Tableau 3.5. Screening antifongique <i>in vitro</i> de l'essence de <i>Thymus vulgaris</i> .	28
Tableau 3.6. Concentrations Minimales Inhibitrices déterminées par macrodilution.	32
Tableau 3.7. Screening antibactérien <i>in vitro</i> de l'essence de <i>Lavandula stoechas</i> .	33
Tableau 3.8. Screening antifongique <i>in vitro</i> de l'essence de <i>Lavandula stoechas</i> .	36

# Liste des Figures

---

Figure 1.1. Quelques composés chimiques retrouvés dans les huiles essentielles.	6
Figure 2.1. Illustration de la méthode de l'aromatogramme.	15
Figure 2.2. Illustration de la méthode de Microatmosphère.	15
Figure 2.3. Illustration du protocole adopté pour le test d'évaluation du pouvoir antifongique dans une matrice alimentaire.	17
Figure 2.4. Illustration de la filtration pour l'analyse microbiologique Jus Orangina <sup>®</sup> .	17
Figure 3.1. Structure chimique des composés détectés dans l'essence de <i>T. vulgaris</i> .	19
Figure 3.2. Chromatogramme de l'essence du <i>T. vulgaris</i> distillée par entraînement.	19
Figure 3.3. Structure chimique des composés majoritaires de l'essence de <i>L. stoechas</i> .	22
Figure 3.4. Action antimicrobienne dose-dépendante de l'essence du thym commun.	26
Figure 3.5. Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle du thym commun.	31
Figure 3.6. Pouvoir antifongique de l'essence en phase vapeur.	37
Figure 3.7. Cinétique de la croissance fongique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pour les différents traitements appliqués au jusOrangina.	38

# Table des Matières

---

Résumé	
Abstract	
Liste des Tableaux	
Liste des Figures	
Liste des Abréviations	
Introduction	1
<b>Chapitre 1. Huiles essentielles</b>	
1.1. Condensé historique :	3
1.2. Définition générale de l'Huile Essentielle	4
1.3. Les types des huiles essentielles	4
1.4. Localisation et rendement	5
1.5. Biosynthèse et composition chimique	6
1.6. Toxicité	8
1.7. Domaines d'utilisation des Huiles essentielles	8
1.7.1. Aromathérapie	8
1.7.2. Aéro-ionisation et désinfection des ambiances	9
1.7.3. Industrie agro-alimentaire :	10
1.7.4. Parfumerie et cosmétologie :	10
1.8. Marché et importance de la filière « Plantes Aromatiques et Médicinales »	11
1.9. Contrôle de qualité et normalisation	11
<b>Chapitre 2. Matériel et Méthodes</b>	
2.1. Matériel	11
2.1.1. Matériel végétal et huile essentielle	11
2.1.2. Souches microbiennes	11
2.1.3. Milieux de cultures et agents chimiques	12
2.1.4. Matrice alimentaire	13
2.2. Méthodes	13
2.2.1. Elaboration des profils chromatographiques	13
2.2.2. Étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles in vitro	14
2.2.2.1. Méthode des aromatogrammes = Technique en milieu solide	14
2.2.2.2. Microatmosphère = méthode en phase vapeur	14
2.2.2.3. Détermination des CMI par dilution en milieu gélosé	16
2.2.3. Test « Bio-contrôle » : Activité antifongique dans une matrice alimentaire	16

### **Chapitre 3. Résultats et Discussion**

3.1. Profil Chromatographique des Huiles Essentielles	18
3.1.1. Composition chimique de l'essence du thym commun	18
3.1.2. Détermination de la composition chimique de l'essence de lavande papillon	21
3.2. Screening antimicrobien de l'huile essentielle du thym commun	26
3.2.1. Aromatogramme antibactérien de l'huile essentielle <i>in vitro</i>	26
3.2.2. Aromatogramme antifongique de l'huile essentielle <i>in vitro</i>	27
3.2.3. Pouvoir antibactérien et antifongique en phase vapeur	30
3.2.4. Détermination des Concentration Minimales Inhibitrices	32
3.3. Screening antimicrobien de l'huile essentielle de lavande	33
3.3.1. Aromatogramme antibactérien de l'huile essentielle <i>in vitro</i>	33
3.3.2. Aromatogramme antifongique de l'huile essentielle <i>in vitro</i>	36
3.3.3. Pouvoir antibactérien et antifongique en phase vapeur	37
3.4. Activité antifongique de l'essence du thym dans une matrice alimentaire	38
<b>Conclusion</b>	40
<b>Références Bibliographiques</b>	42

# RESUME

---

L'objectif assigné à ce travail consiste à valoriser l'essence aromatique de deux plantes médicinales (*Thymus vulgaris* et *Lavandula stoechas*) en aromathérapie anti-infectieuse et/ou comme conservateur naturel dans les denrées alimentaires.

La composition chimique de l'huile essentielle (HE) a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse. L'essence du thym commun est caractérisée par la prédominance du carvacrol comme composé majoritaire avec un taux de 83.8%, suivi par le *p*-cymène (8.15%) et  $\gamma$ -terpinène (4.96%). La lavande contient l'acétate de linalyle et linalool comme composés prédominants avec des taux de 36.6% et 33.4%, respectivement.

Le screening antimicrobien des HE a été accompli par plusieurs méthodes sur différentes souches bactérienne et mycélienne. En aromatochrome, des résultats peu reluisants ont été obtenus avec l'HE de lavande où les diamètres des zones d'inhibition (DZI) varient entre 12 à 28 mm pour les bactéries et entre 12 à 40 mm pour les souches fongiques, en microatmosphère les diamètres des zones d'inhibition (DZI) varient entre 12 à 25 mm pour les bactéries et entre 10 à 22 mm pour les souches fongiques.

En revanche, l'HE du thym a exhibé une activité inhibitrice remarquable sur la croissance de certaines bactéries, en particulier *S. aureus*, *K. pneumoniae* et *E. coli* avec des DZI de l'ordre de 60, 85 et 62 mm respectivement. De meilleurs résultats ont été obtenus avec les souches fongiques où une inhibition totale (85 mm) a été notée pour *A. niger*, *Fusarium* sp. et *Verticillium* sp. En phase vapeur, l'HE est douée d'un pouvoir fongicide sur toutes les souches à la dose de 60  $\mu$ L. De plus, cette action inhibitrice est « dose-dépendante ». Les souches *pseudomonadaceae* présente une résistance à l'action inhibitrice d'HE du thym et de la lavande pour les trois doses utilisées. Une méthode qualitative, dilution en milieu gélosé, a été explorée afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Toutes les souches bactériennes et levuriformes ont des CMI faibles (0.031%).

En outre, l'efficacité antifongique de cette essence a été vérifiée dans une matrice alimentaire (Boisson Orangina), seule ou en association avec un traitement thermique. Une inhibition totale et rapide de *Saccharomyces cerevisiae* a été obtenue dans les jus supplémentés avec l'HE comme conservateur antimicrobien, en comparaison avec les jus conservés par des additifs de synthèse.

En définitive, les résultats obtenus, lors de ce screening antimicrobien, laissent entrevoir des perspectives d'application de l'essence du thym commun en aromathérapie anti-infectieuse ou, éventuellement, comme conservateur antimicrobien naturel dans les denrées alimentaires. Les aspects toxicologique et organoleptique doivent être abordés ultérieurement. L'avenir nous dira l'impact réel de ces nouvelles acquisitions.

**Mots-clés:** Conservateur alimentaire naturel; Aromathérapie; *Thymus vulgaris*; Carvacrol; *Lavandula stoechas*.

# ABSTRACT

---

The aim of this study was to assess the potential use of the volatile fraction of twomedicinal plants (*Thymusvulgaris* and *Lavandula stoechas*) in aromatherapy and/or as a natural preservative for food.

The chemical composition of essential oils (EO)was determined by gas chromatography-mass spectrometry. *Thymus vulgaris* essential oil (TVEO) is characterized by the predominance of carvacrol as a major compound with a rate of 83.8%, followed by p-cymene (8.15%) and  $\gamma$ -terpinene (4.96%). Lavender contains linalyl acetate(36.6%) and linalool (33.4%) as predominant constituents.

The antimicrobial screening of EO has been evaluated by several methods against a wide spectrum of bacterial and fungal strains. By disc diffusion method, a medium diameter of inhibitory zone (DIZ) were obtained with lavender EO, ranged between 12 to 28 mm for the bacteria and 12 to 40 mm for fungi. Besides, TVEO exhibited a promising inhibitory action in particular with *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *E. coli*while the DIZ varied from 60 to 85 mm. Rurther, fungal strains (*A. niger*, *Fusarium* sp. and *Verticillium* sp.) were inhibited total by TVEO. In the vapor phase, TVEO possess a fungicidal power against all sspecies, in particular at the fose of 60  $\mu$ L. Else, DIZ increased with the increasing of EO volume. Minimum inhibitory concentration has been determined by agar dilution method and revealed that all bacteria and yeasts have a lower MIC values (0.031%).

In addition, antifungal efficacy of TVEO was assessed in a real food system (Orangina juice), alone or in combination with thermal treatment. A complete and rapid inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* was obtained in juices treated with TVEO as antimicrobial preservative, in comparison with the juices preserved by synthetic additives.

Finally, our findings suggest the potential use of TVEO as a bioactive component in aromatherapy or as a natural ingredient to preserve food. However, further studies will be needed in the future to explore its toxicity and organoleptic parameters before final application in industry or pharmaceuticals.

**Keywords:**Natural food preservative; Carvacrol; Aromatherapy; *Thymus vulgaris*; *Lavandula stoechas*.

# الملخص

الهدف المحدد لهذا العمل هو تثمين النشاط البكتيري و الفطري لزيوت الأساسية للزعيترة و الخزامة , و استخدام الزيت الأساسي لزعيترة كمادة حافظة طبيعية للمواد الغذائية.

كشفت التركيب الكيميائي للزيت الأساسي للزعيترة (HE)، على وجود 13 مكون. المكون الرئيسي هو carvacrol بمعدل 83.8٪، يليها p-cymène (8.15٪) و  $\gamma$ -terpinene 4.96٪.

بالنسبة للزيت العطري للخزامة المكون الرئيسي هو linalyle'acétate بمعدل 36.6٪، و يليه linalool بمعدل 33.4٪. فحص مضاد للمكروبات تم إنجازه بعدة طرق مختلفة في الطور السائل والطور الغازي، على ستة سلالات بكتيرية وستة سلالات فطرية. النشاط المثبط ملحوظ على نمو جميع السلالات باقطار تثبيط تتراوح بين 12 الى 28 مم بالنسبة للبكتيريا وبين 10 و 22 مم بالنسبة للفطريات هذا فيما يخص النشاط المثبط للزيت الأساسي للخزامي

على عكس الزيت الأساسي للزعيترة الذي يملك نشاط مثبط ملحوظ حيث *S. aureus*, *K. pneumoniae* et *E. coli* لهم اقطار النشاط التثبيطي 60,85,62 مم على التوالي. و افضل النتائج تحصلنا عليها مع السلالات الفطرية اين تسجيل التثبيط *A. niger*, *Fusarium sp.* و *Verticillium sp.*

هذا النشاط تم تقييمه اعتمادا على الطريقة النوعية، اما الطريقة الكمية (تخفيف التركيز) استخدامها لتحديد الحد الأدنى المثبط كل السلالات البكتيرية الحساسة للنشاط المثبط للزيت الأساسي للزعيترة و سلالات الخمائر لها أدنى تركيز مثبط من اجل 0.03٪.

فيما يخص الفعالية المضادة للفطريات تم اختبارها على نموذج غذائي كمادة حافظة مع او بدون علاج حراري. تم تسجيل تثبيط تام وسريع لخميرة الجعة في العصير المرفق مع الزيت الأساسي كحافظ مضاد للمكروبات مقارنة مع العصير الذي يحتوي على مواد حافظة اصطناعية.

الختام النتائج المحصل عليها في هذا الفحص المضاد للمكروبات جد مشجعة من اجل استعمال الزيت الأساسي للزعيترة كمادة حافظة طبيعية في المواد الغذائية.

الكلمات المفتاحية: Conservateur alimentaire naturel; Aromathérapie; *Thymus vulgaris*; Carvacrol; *Lavandula stoechas*

# INTRODUCTION

---

Pendant des milliers d'années, les herbes ont fourni des remèdes pour presque tous les types de maladies. Avec leurs nombreuses propriétés thérapeutiques, elles sont utiles pour la prévention et pour améliorer l'état de bien-être général, surtout si elles s'accompagnent d'une alimentation saine. Les herbes sont cultivées et transformées à des fins culinaires, cosmétiques, industrielles et médicinales ainsi que pour l'élaboration de parfums. Une grande partie de l'intérêt manifesté initialement à l'égard des aliments fonctionnels et des produits nutraceutiques reposait sur les utilisations médicinales des herbes. L'histoire de la nutraceutique naquit ainsi et, avec les progrès de la science, de nouveaux principes actifs et de nouvelles propriétés pharmacologiques ont permis de faire des herbes et des plantes à parfum d'authentiques médicaments. On s'aperçoit que l'industrie pharmaceutique ne peut s'en passer des essences aromatiques dont les nombreuses actions biologiques peuvent corriger et traiter de nombreux phénomènes et infections microbiennes et/ou lutter contre certaines maladies chroniques (Goetz et Ghedira, 2012 ; Kaloustian et Hadj-Minaglou, 2013).

Par ailleurs et en raison du souci croissant des consommateurs aux denrées contenant des conservateurs chimiques, la recherche des additifs naturels, particulièrement d'origine végétale, a notamment augmenté ces dernières années. Il y a une demande croissante des consommateurs pour des produits alimentaires sans conservateurs de synthèse. De plus, l'émergence de pathogènes résistants aux antimicrobiens classiques nécessite de trouver d'autres alternatives. L'industrie alimentaire est donc particulièrement intéressée par le développement de nouveaux conservateurs naturels (Burt, 2004 ; Hyldgaard *et al.*, 2012). Cette tendance a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances.

Bien qu'une grande partie de ces composés aient été catalogués, il reste encore de nombreuses autres substances alimentaires à identifier et à évaluer. Les recommandations alimentaires doivent également être étayées par des études scientifiques afin d'établir une base scientifique solide en matière d'allégations liées aux aliments fonctionnels. Cette dernière perspective permet d'élargir le champ de valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM), (autrefois restreint du point de vue économique, à l'extraction de molécules olfactives), par l'exploitation des nombreuses et diverses activités biologiques, substantiellement évoquées par la médecine traditionnelle, que nous allons recenser et corrélérer à certains types de structures chimiques.

Dans le cadre d'un programme d'investigations visant, d'une part, la connaissance des PAM de notre pays (Algérie), et d'autre part, la recherche de procédés modernes de conservation des aliments, inspirés des techniques traditionnelles, il était nécessaire de disposer de techniques simples, rapides, reproductibles, et économiques pour l'étude des propriétés antiseptiques des Huiles Essentielles (HE).

Aussi, l'importance de pousser scientifiquement les investigations sur les HE comme source potentielle de nouveaux composés antimicrobiens, à visée thérapeutique, vient de l'utilisation traditionnelle des plantes à des fins médicinales. Cependant, la consommation de ces produits naturels nécessite une recherche plus approfondie dans ce domaine (**Burt, 2004**).

D'autre part, notre pays, de par sa position géographique et la diversité de son climat, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques à même de « booster » la culture et l'exploitation industrielle des PAM. Malheureusement, rares sont les plantes qui sont cultivées d'une façon intensive pour en extraire leurs principes actifs à des fins industrielles (conservation des denrées alimentaires). Nous citerons, entre autres, lavande papillon (*Lavandula stoechas* L.) et thym commun (*Thymus vulgaris* L.) dont la fraction aromatique reste, hélas, peu étudiée et exploitée dans les industries alimentaires.

Problématique

De ce fait, l'objectif assigné à notre travail consiste à étudier le pouvoir antibactérien et antifongique (sur des souches de références et isolées cliniquement) de l'extrait aromatique de deux plantes (*L. stoechas* et *T. vulgaris*) qui demeurent très peu exploitées dans les domaines nutraceutique et agro-alimentaire malgré leurs immenses potentialités thérapeutique et antiseptique (**Grespan et al., 2014 ; Fani et Kohanteb, 2017 ; Amaraet al., 2017**). Aussi, plusieurs méthodes microbiologiques et approches techniques ont été examinées lors de cette étude.

Notre travail comporte donc les étapes suivantes

- Déterminer la composition chimique des essences aromatiques de thym commun et lavande sauvage par Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse (CG-SM).
- Evaluer l'activité antimicrobienne de l'HE en phase liquide (antibiogramme ou plus précisément aromatogramme) et en phase vapeur (microatmosphère) ont été les deux techniques préliminaires effectuées pour y sélectionner les souches sensibles à l'action inhibitrice des HE.
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), par dilution en milieu gélosé, a été accomplie uniquement sur les souches sensibles.
- Tester l'efficacité antifongique de HE de *thymus vulgaris* dans une matrice alimentaire (Boisson sucrée gazéifiée type Orangina) afin de cerner son potentiel application comme conservateur alimentaire.

## Chapitre 1

# HUILES ESSENTIELLES

---

### 1.1. Condensé historique :

Depuis la plus haute antiquité, sous toutes les civilisations, nos ancêtres ont su utiliser les plantes aromatiques et médicinales (PAM). L'Égypte ancienne maîtrisait la fabrication des baumes et des huiles aromatiques pour les soins du corps, les cérémonies et l'embaumement des morts. Les Grecs et les Romains étaient de grands amateurs de parfums, onguents et bains aromatiques. De même, la Chine, berceau de la phytothérapie et l'Inde, ont capitalisé des connaissances en la matière qu'ils ont même consignées dans des ouvrages dédiés aux plantes à parfums (**Bardeau, 2009**).

Le terme « huile essentielle » (HE) est une contraction de l'expression « huile quintessentielle ». Son origine provient de l'idée Aristotélicienne selon laquelle la matière est constituée de quatre éléments: le feu, l'air, la terre et l'eau. Le cinquième élément, autrement nommé quintessence, était alors considéré comme étant l'esprit ou la force vitale. Dans le passé, les anciens assimilaient la distillation et l'évaporation, comme des procédés permettant d'extraire l'esprit de la plante. Cette dernière qualification fait, une fois de plus, référence au concept d'extraction de la force vitale de la plante. Au cours de la Renaissance, un médecin réformateur suisse, du nom de Paracelse (1493-1541), donna un sens particulier au terme huile essentielle. Sa théorie le définit comme le dernier extrait possible le plus sublime correspondant à la « *Quinta Essentia* », le principe actif du médicament. L'isolation de cet extrait devrait être, selon lui, le but de la pharmacie (**Garreta, 2007 ; Lardry et Haberkorn, 2007 ; Bardeau, 2009**).

L'histoire des HE commence cependant 2000 à 3000 ans avant cette époque. Chez les Egyptiens, l'essence de térébenthine était déjà utilisée et tout porte à penser que certains parfums étaient obtenus sous forme d'huiles distillées. L'art de la distillation, initié par les Egyptiens et les Perses, s'améliora grandement au cours du IX<sup>e</sup> siècle sous l'impulsion des Arabes avec, notamment, le développement de l'alambic attribué à Avicenne (980-1037). La science des HE prit ensuite le large pour gagner l'Europe au cours des croisades durant le XIII<sup>e</sup> siècle. Beaucoup de savants se passionnèrent pour la science de la distillation. Les premières universités Européennes furent à l'origine du démarrage de la Pharmacopée. Le développement des procédés de production et des connaissances de ces extraits fut alors majoritairement mené par des pharmaciens. Durant les siècles qui suivirent, les HE étaient principalement utilisées pour leurs vertus thérapeutiques et ne nécessitaient qu'une production minimale, ce qui n'est plus le cas de nos jours. Avec Paracelse se développèrent l'Alchimie et la notion de "Quintessence" des plantes tomba aussitôt dans l'oubli (**Gilly, 1997 ; Bodiou, 2008**).

Il aurait fallu attendre 1928 pour que « l'aromathérapie moderne » soit ressuscitée grâce à un chimiste Français (Gatefosse) qui constata les énormes pouvoirs de guérison des HE. Les progrès de la science et des techniques d'analyses permirent de véritables investigations de ces molécules, contribuant au redéploiement international de l'aromathérapie à l'échelle du monde entier.

Les HE font désormais partie de notre quotidien. Leurs utilisations s'étant généralisées dans de nombreux domaines, des industries pharmaceutiques et cosmétiques à l'agro-alimentaire, en passant par l'aromathérapie et les parfums d'ambiance, mais également en agriculture où elles sont utilisées en tant que pesticides naturels (Scimeca et Tétou, 2005 ; Anton et Lobstein, 2005 ; Roux, 2008).

## 1.2. Définition de l'Huile Essentielle

Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans des tissus végétaux spécialisés, responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés à se solubiliser dans les graisses par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (Telphon et De Paillette, 2003 ; Zhiri et Baudoux, 2005 ; Raynaud, 2006 ; Grosjean, 2011).

En se référant à la Norme Française NF T 75-006 (AFNOR, 2000), l'HE est définie comme « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation sèche ». Cette définition, basée sur les procédés d'extraction, est restrictive et exclut aussi bien les produits obtenus par extraction à l'aide de solvants (concrètes et absolues) que ceux obtenus par tout autre procédé (Extraction par Fluide Supercritique (SFE) et extraction par micro-ondes sans solvant (Solvent Free Microwave Extraction)) (Roux et Catier, 2007).

Pour certains auteurs (Garetta, 2007), il est important de distinguer HE et essence ; cette dernière est une sécrétion naturelle élaborée par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, variable selon la partie de la plante considérée. En revanche, une HE est un extrait naturel de matières premières d'origine végétale, obtenue par distillation par la vapeur d'eau, c'est-à-dire que l'HE est l'essence distillée.

## 1.3. Les types des huiles essentielles

Au niveau commercial, différents types d'HE existent (AFSSAPS, 2008) :

- HE déterpénée, partiellement ou totalement privée des hydrocarbures monoterpéniques ;
- HE rectifiée, ayant subi une distillation fractionnée afin de supprimer des composants toxiques ;
- HE privée de « X », ayant subi une séparation partielle ou totale d'un composant « X », par un moyen physique. Ainsi, l'HE de menthe riche en menthol peut être partiellement démentholée, après un refroidissement entraînant la cristallisation, puis la filtration du menthol lévogyre.

D'autres labels, appellations et spécifications existent :

- HE dites "HEBBD"(Botaniquement et Biochimiquement Définis). Cela signifie que l'on connaît la variété botanique, et que l'on peut définir la composition chimique (ou biochimique) ;
- HE dites "HECT"dont on connaît la composition chimique avec précision, et pour lesquels on peut garantir le constituant majoritaire ; Par exemple le menthol est majoritaire dans l'HE de menthe ;
- HE 100% purs : garantis sans ajout d'autres extraits proches, comme l'ajout d'une HE de lavandin dans une HE de lavande ;
- HE 100% naturels : garantis sans ajout de molécules de synthèse, comme l'ajout de linalool de synthèse dans une HE de coriandre (**Zhiri et Baudoux, 2005**).

#### **1.4. Localisation et rendement**

Les HE sont des sécrétions naturelles élaborées par le végétal et contenues dans les cellules ou parties de la plante comme celles des fleurs (rose), sommités fleuries (lavande), feuilles (citronnelle), écorces (cannelier), racines (iris), fruits (vanillier), bulbes (ail), rhizomes (gingembre) ou graines (muscade). Pour certaines HE comme celles de lavande ou de sauge, c'est la plante entière qui est utilisée (**Serrato-Valenti *et al.*, 1997 ; Parthasarathy *et al.*, 2008**).

Seules les parties sécrétrices ou les plus concentrées de la plante sont récoltées à la période de rendement optimum : avant la floraison (menthes), pendant (lavandes) et après celle-ci (plantes à graines) ou encore après la rosée du matin (fleurs fragiles) (**Maffei *et al.*, 1989 ; Sallé, 1991**).

Les HE sont produits dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des structures histologiques ou glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles sont alors stockées dans des cellules à HE (Lauraceae), dans des poils sécréteurs (Geraniaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Asteraceae). Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essences sont localisées dans les tissus internes (**Deysson, 1978 ; Bruneton, 1999 ; Hallahan *et al.*, 2000 ; Anton et Lobstein, 2005 ; Festy, 2009**).

Pour certaines plantes, l'HE peut être extraite de plusieurs organes. Toutefois, si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une HE, sa composition peut admettre des variations importantes selon sa localisation (**Gilly, 1997 ; Lis-Balchin, 2006 ; Bardeau, 2009**).

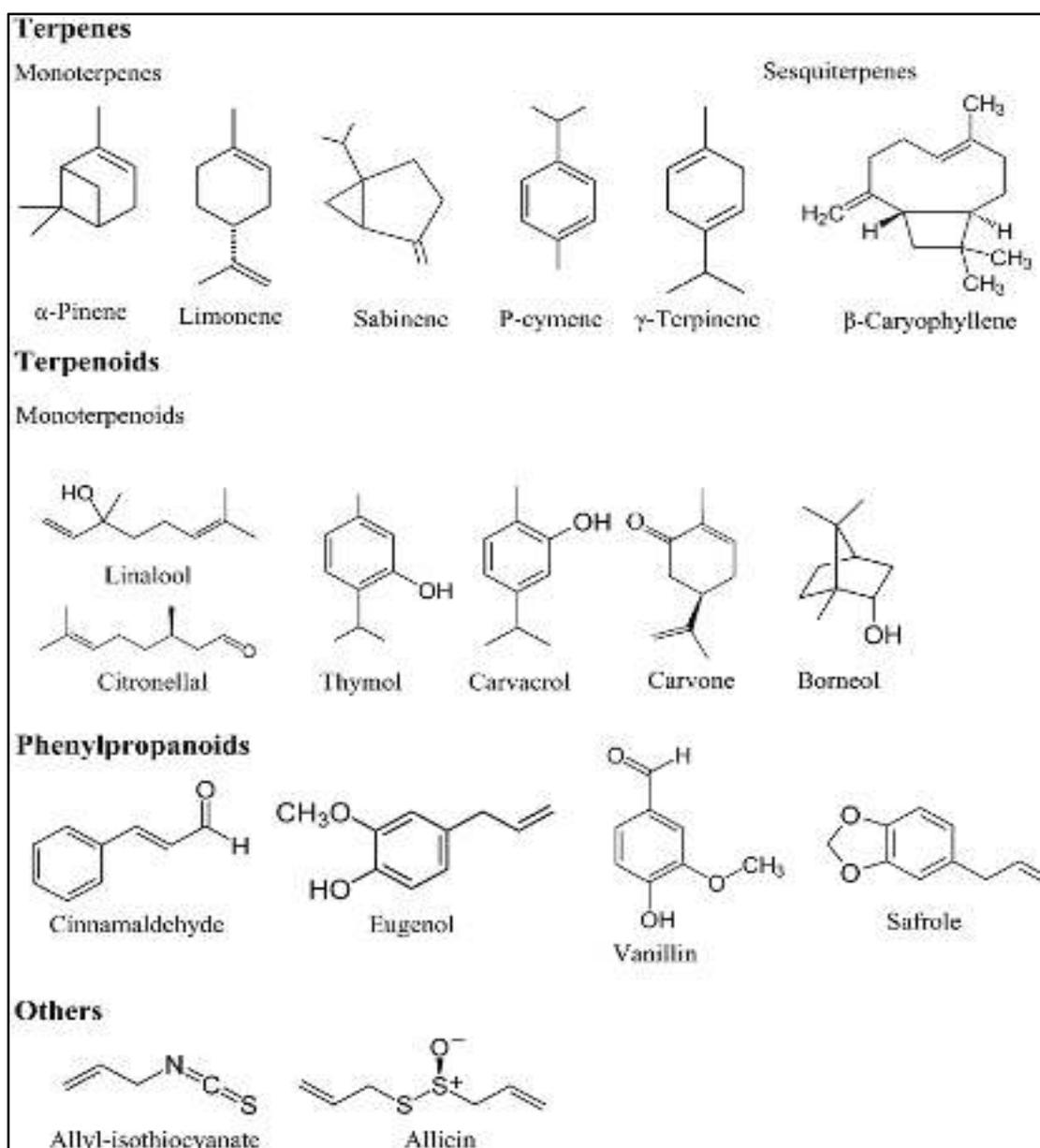
Les quantités d'HE produites par les plantes sont minimales, entraînant des rendements d'extraction extrêmement faibles, généralement inférieurs à 2%. Le rendement le plus faible est observé pour l'iris qui demande environ 4 kg de poudre pour obtenir 1 g d'absolue, ce qui explique le tarif exorbitant de cette huile (**Shiva, 2002**).

#### **1.5. Biosynthèse et composition chimique**

Les composants des HE sont génériquement dits « aromatiques » en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique, ce qui peut prêter à confusion. Leur masse moléculaire, relativement faible, leur confère un caractère volatil à la base des propriétés olfactives.

La plupart des HE sont poly-moléculaires (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'HE de rose). Il existe quelques HE dites mono-moléculaires, telle la menthe pouliot. Le citron et le clou de girofle sont bi- et tri-moléculaires.

La majorité des constituants des HE appartiennent, de façon quasi-exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autre part (**Figure 1.1**). Actuellement, plus de 3000 constituants ont été isolés à partir des essences (**Bruneton, 1999 ; Clarke, 2002 ; Rhayour, 2002 ; Chami, 2005 ; Baser et Buchbauer, 2010 ; Carson et Hammer, 2011 ; Rhind, 2012**).



**Figure 1.1.** Quelques composés chimiques retrouvés dans les huiles essentielles (**Burt, 2004**).

## 1.6. Toxicité

Les HE contiennent des milliers de composants qui les rendent très efficaces mais aussi dangereuses. Certains composants aromatiques peuvent être nocifs, allergisants ou cancérigènes. La toxicité des HE

et les propriétés mutagènes ou cancérigènes de leurs composés restent encore mal connues. Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits phytopharmaceutiques, celle des HE est moins investiguée (**Tisserand et Young, 2014**).

## **1.7. Domaines d'utilisation des Huiles essentielles**

La composition chimique des HE leur confère aussi bien des propriétés odorantes qu'antimicrobiennes. Ces caractéristiques offrent des débouchés dans de nombreux domaines.

### **1.7.1. Aromathérapie**

#### **1.7.1.1. Définition de l'aromathérapie**

Branche de la phytothérapie, l'aromathérapie a acquis ses lettres de noblesse et est devenue une thérapeutique à part entière. Si l'on se réfère à l'acception étymologique et moderne du terme, l'aromathérapie se définit comme « le traitement, à titre préventif ou curatif, des maladies physiques et psychosomatiques par les « arômes végétaux » : les HE et les essences extraites des plantes odoriférantes, qui possèdent des vertus médicinales, sont administrées par les différentes voies compatibles avec leur nature huileuse ». L'aromathérapie est donc moins "douce" qu'il n'y paraît (**Belaiche, 1979 ; Nelly, 2007**). Les HE diffèrent des antibiotiques qui sont, par définition, des substances mortes, hostiles à la vie et perturbatrices des métabolismes vitaux (**Baudoux, 2000**).

#### **1.7.1.2. Intérêt de l'aromathérapie**

Actuellement, un retour très net aux HE pour la désinfection et le traitement des maladies infectieuses a été signalé (**Giraud-Robert, 2005 ; Inouye et Abe, 2007 ; Derbré, 2009**). Ce retour est stimulé par le danger que représente l'usage de certains antibiotiques (ATB). Les HE ont une efficacité durable sans aucune résistance contrairement aux antibiotiques (**Valnet et al., 1978**). Deux récepteurs offrent un abord évident quant à la puissance des huiles : la peau et les sphères oto-rhino laryngologique et broncho-pulmonaire. Cette efficacité est due au fait qu'elles contiennent plus de 20 molécules actives différentes, tandis que dans le médicament de synthèse, on ne peut évaluer les interactions de plus de trois molécules. Les HE ont donc une action globale, un « large spectre » sur l'ensemble de la physiologie (**Franchomme et al., 1990**).

Si beaucoup de monde limite l'aromathérapie à la lutte anti-infectieuse, plusieurs études attribuent aux HE de nombreuses propriétés thérapeutiques (**Goetz et Ghedira, 2012**). Beaucoup soulageront diverses douleurs (action anti-inflammatoire, antalgique et antispasmodique). Certaines possèdent des propriétés stimulantes et ré-équilibrantes de grandes fonctions : détoxification par stimulation de l'élimination des déchets, régulation des systèmes hormonaux et nerveux, de la digestion et de la circulation (**Buckle, 1992 ; Zhiri et Baudoux, 2005 ; Goetz, 2007 ; Rhind, 2012**). Mais il serait dommage de restreindre l'utilisation des HE sur le plan physique et de ne voir en elles qu'une action moléculaire. C'est sur ce plan psychologique qu'il reste, sans doute, le plus à découvrir au sujet des HE (**Festy, 2008 ; Aiache et al., 2011**). Quoiqu'il en soit, le marché de l'aromathérapie et de ses dérivés est en pleine expansion, notamment à travers le développement de salons de massages, de bien-être et d'ouvrages consacrés à cet art (**Baudoux, 2000 ; Roux, 2008**).

### **1.6.2. Aéro-ionisation et désinfection des ambiances**

L'utilisation de produits désinfectants classiques se fait, de plus en plus, au détriment de la nature et des hommes puisque les produits chimiques utilisés sont souvent dangereux à manipuler et participent à la dégradation de l'environnement (**Druilles *et al.*, 1995**).

Etant volatiles, les HE sont utilisées en tant qu'agents de préservation pour le contrôle de l'hygiène de l'air des systèmes de climatisation, notamment dans le milieu hospitalier, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air (**De Billerbeck *et al.*, 2002 ; Pibiri, 2005**).

En milieu hospitalier, l'assainissement de l'atmosphère d'une pièce est réalisé par la diffusion des HE. C'est un procédé permettant de répandre un brouillard (microgouttelettes d'HE) de molécules actives potentiellement antibactériennes, antivirales et immunostimulantes. Bien conduite, la diffusion atmosphérique devient un procédé idéal visant à la protection et à la prévention contre les infections nosocomiales et les pathologies hivernales. Elle contribue largement à la désinfection des locaux, qu'ils soient industriels ou destinés aux soins médicaux (**Pibiri, 2005**).

Des essences naturelles (citron et lilas), à activité bactéricide, acaricide et fongistatique, entrent dans la composition d'un produit, le Paragerm<sup>®</sup>, solution volatile qui s'est révélée sans toxicité pour l'homme aux doses utilisées (**Mallea *et al.*, 1979**). Aujourd'hui, des Normes strictes sont édictées par des organismes spécialisés pour une utilisation hospitalière à hauts risques de contamination.

Cependant, il est important de souligner que l'on ne doit jamais diffuser des HE en continu, ce qui aurait pour effet de saturer l'atmosphère en molécules aromatiques, en le rendant irritant pour les muqueuses des bronches, voire potentiellement toxique (**Blanc, 1998**).

### **1.7.2. Industrie agro-alimentaire :**

Outre la conservation des denrées alimentaires, les HE sont rajoutées pour rehausser le goût et empêcher le développement des contaminants alimentaires et l'inhibition de la toxinogénèse des champignons (**Tajkarimi *et al.*, 2010 ; Hyldgaard *et al.*, 2012**). Cette application, déjà bien développée, se renforce ces dernières années grâce à des décisions de sécurité importantes. Ceci engage les industriels à trouver des additifs de substitution permettant d'assurer la sécurité alimentaire. De plus, la tendance actuelle à consommer du « naturel » poussent les industriels à utiliser, de plus en plus, les HE en tant qu'additifs aromatisants. Ce retour au naturel est lié à une prise de conscience générale tournée vers la protection de l'environnement avec, entre autres, la réduction de la consommation en produits phytosanitaires de synthèse et le développement de l'agriculture biologique. Dans ce contexte, les HE constituent, une fois de plus, une voie d'intérêt et de recherche (**Zaika, 1988 ; Hulin *et al.*, 1998 ; Burt, 2004 ; Fisher et Phillips, 2008 ; Rai et Chikindas, 2011**).

Depuis peu, les industriels ont souhaité l'utilisation d'HE comme conservateurs, au détriment des molécules de synthèse classiques couramment utilisées, telles que les parabènes. Plusieurs travaux ont montré que les HE de thym, de cannelle, d'origan et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxinogénèse de plusieurs bactéries et champignons responsables d'infections alimentaires (**Kalemba et Kunicka, 2003, Hyldgaard *et al.*, 2012**).

A titre d'exemple, le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros consommateur d'HE. Aussi, les fabricants d'aliments préparés en utilisent, de plus en plus, car le consommateur recherche davantage les produits avec des ingrédients naturels (**Holley et Patel, 2005**).

### **1.7.3. Parfumerie et cosmétologie :**

Un grand nombre d'HE est utilisé dans l'élaboration de la majorité des parfums et produits de toilette. Ces essences servent à préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et anti-oxydante tout en leur assurant une odeur agréable (**Aquino, 2002 ; Sayous et Chevallier, 2008**). De même, certains constituants chimiques isolés à partir d'HE peuvent faire l'objet de transformations chimiques donnant naissance à de nouvelles odeurs. Ainsi, à partir de l'eugénol tiré de l'essence de girofle, on aboutira à l'isogénol qui a une odeur d'œillet (**Chaumont et Millet-Clerc, 2011**).

A noter que le terme « huile essentielle » n'est pas employé ; la législation Européenne (Code de la santé publique (article R.5131-4 8°)) impose, en effet, le mot « Parfum » («Fragrance » en anglais) qui englobe l'ensemble des compositions aromatiques ou parfumantes et leurs matières premières. En plus des HE, il peut s'agir également d'un ou plusieurs constituants extraits d'une HE. C'est le cas du « 1,8-cinéol » connu commercialement sous le nom d'eucalyptol, principal constituant de la majorité des HE d'*Eucalyptus*. Il entre dans la fabrication des savons de toilette, dentifrices et lotions désodorisantes(**Aburjai et Natsheh, 2003 ; Martini, 2011**).

Toutefois, dans le cas où la substance utilisée fait partie de la liste des 26 molécules identifiées comme étant susceptibles d'entraîner des réactions allergiques, telles que le citral, le géraniol ou le linalool, sa dénomination chimique doit être inscrite parmi la liste des ingrédients (**AFSSAPS, 2008**).

## **1.8. Marché et importance socioéconomique de la filière « Plantes Aromatiques et Médicinales »**

Vu la diversité de ce secteur, il est difficile d'obtenir des données fiables. La plupart des producteurs fournissent des chiffres peu précis et les statistiques sont incomplètes.

Le volume total d'HE produit dans le monde en 1995 est estimé à 45000 tonnes. Les 16 essences les plus importantes (production supérieure à 500 tonnes) représentent 90% du volume total (**Gilly, 1997**).

On en trouve dans ce groupe:

- les principales sources d'arômes alimentaires (agrumes et menthes) ;
- les essences utilisées en gros volume (compositions pour détergents et déodorants ménagers) ;
- les produits servant à des hémi synthèses ou à l'extraction d'isolats naturels.

Chaque continent et région possède sa propre flore et donc une production d'HE caractéristiques. En revanche, si l'ensemble des pays du globe y participent à cette production, ce marché est essentiellement dominé par quelques pays. En 2008, le Brésil et l'Inde se partageaient la moitié de ce marché avec des productions respectives de 28.6 % et 25.6 %.

La production mondiale d'HE s'évalue à environ dix milliards de dollars US par an dont 55% provenant du tiers-monde. L'instabilité des cours des HE, comme celle de nombreuses matières premières naturelles, constitue une contrainte de taille pour les différents intervenants de la filière.

Les essences aromatiques sont souvent associées à une qualité inconstante, des approvisionnements irréguliers et des prix instables qui sont autant de handicaps à leur utilisation dans l'industrie (Seidemann, 2005).

Sur le plan socio-économique, la collecte des PAM constitue un moyen pour diversifier la production agricole et demeure une activité génératrice de revenu pour les populations rurales locales.

Actuellement, parmi les secteurs à fort potentiel figurent les PAM dites « biologiques » qui sont très recherchées sur le marché international.

### **1.9. Contrôle de qualité et normalisation**

L'importance et le développement du marché des HE s'expliquent par le nombre et la diversité des domaines d'application de ces extraits. Ils induisent aussi la nécessité de proposer des méthodes de contrôle analytique garantissant leurs caractéristiques. C'est pourquoi, ces extraits font l'objet de nombreuses analyses dont les objectifs principaux sont la caractérisation des substances composant l'HE ou la découverte de nouvelles molécules, mais également le contrôle de qualité et la recherche d'adultération dans un milieu où la fraude est tentante, notamment à cause des enjeux économiques.

Le linalool de synthèse est beaucoup moins coûteux que l'HE de lavande, de même pour le menthol de la menthe poivrée. Des fournisseurs peu regardants peuvent être tentés de couper, altérer et dénaturer les HE.

Les nombreux paramètres intervenant dans la composition des HE ont amené les organismes de normalisation à imposer un certain nombre de règles. Les méthodes de détermination des caractéristiques physico-chimiques à utiliser sont décrites avec précision dans le recueil de normes publiées par l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 2000), elles-mêmes identiques aux Normes Internationales de l'ISO.

Les points de contrôles à effectuer, pour se prémunir de la falsification des HE, concernent l'origine géographique, l'espèce botanique, l'organe producteur ainsi que les caractéristiques organoleptique et physico-chimique. En plus de ces points de contrôle, on peut conclure que la meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une HE se base sur le profil chromatographique. Il permet de connaître, exactement, la composition chimique et de chercher d'éventuelles traces de produits indésirables, tels les pesticides ou des produits chimiques ajoutés (Cserhádi, 2010).

D'une manière générale, la grande diversité des molécules chimiques contenues dans ces HE se traduit par des indications thérapeutiques très diverses. Les HE à usage pharmaceutique doivent être conformes aux normes des monographies de la **Pharmacopée Européenne (2007)**.

La meilleure carte d'identité qualitative et quantitative de l'HE reste cependant son profil chromatographique, même si d'autres techniques alternatives sont utilisées. En effet, malgré les importantes innovations instrumentales réalisées ces dernières années, la détection de tous les constituants d'une HE reste une tâche extrêmement difficile, qui nécessite souvent l'emploi de plusieurs techniques analytiques complémentaires (Dris et Jain, 2004 ; Cserhati, 2010)

## Chapitre 2 :

# MATERIEL ET METHODES

---

Notre étude s'est étalée sur une période de 6 mois, de février jusqu'à juillet 2017. Les différentes expérimentations ont été effectuées dans les structures suivantes :

- Laboratoire Bactériologie de l'Etablissement Public Hospitalier (EPH) de la wilaya de Blida.
- Service Microbiologie Alimentaire du Laboratoire d'Hygiène relevant de l'Etablissement de Proximité de la Santé Publique (EPSP) de Blida.
- Service microbiologie de l'Algérienne des Eaux (ADE) de Chiffa, Blida.

Par ailleurs, l'objectif assigné à cette étude consistait à tester, *in vitro*, le pouvoir antibactérien et antifongique de l'essence de thym et de lavande, séparément et sur une large gamme de souches microbiennes (de référence ou isolées cliniquement), à travers l'application de plusieurs méthodes microbiologiques. Par la suite, leur efficacité antifongique a été appréciée dans une matrice alimentaire, en comparaison avec des conservateurs de synthèse. En outre, la composition chimique des essences aromatiques a été déterminée par Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse.

## 2.1. Matériel

### 2.1.1. Matériel végétal et huile essentielle

Les huiles essentielles de thym commun et de lavande papillon ont été fournies par la société « Ziphee.Bio » de production des huiles essentielles et des engrais organiques, sise à Lakhdaria (Bouira). Le procédé d'extraction utilisé est l'entraînement à la vapeur d'eau conduit à échelle industrielle (alambic de 2 m<sup>3</sup>) sous pression. Aussi, les HE sont certifiées « 100 % naturelle » car n'ayant été additionnées ou mélangées à aucun solvant organique durant la phase de production. Les HE ont été conservés dans des flacons stériles teintés à 4°C et à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail, pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation, d'altération chimique ou de contamination microbienne.

### 2.1.2. Souches microbiennes

L'activité antibactérienne a été évaluée sur deux souches de référence ATCC (American Type Culture Collection) et quatre souches bactériennes (**Tableau 2.1**) isolées cliniquement à partir des prélèvements de malades ayant contracté différentes infections. Concernant les souches fongiques, nous avons utilisé quatre champignons filamenteux (moisissures) et deux levures (**Tableau 2.2**). Toutes les souches bactériennes ont été isolées et identifiées, soit au niveau du laboratoire Bactériologie de l'EPH de Blida ou encore celui du Laboratoire d'Hygiène de Blida. Ces bactéries et champignons ont été conservés et maintenus en vie, par des repiquages continus, sur des milieux de culture adéquats.

**Tableau 2.1.** Souches bactériennes utilisées pour le screening antibactériennes huiles essentielles de *Lavandula stoechas* et *Thymus vulgaris*.

Souche	Origine	Famille
<b>Bactéries à Gram -</b>		
<i>Escherichia coli</i>	Urine	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urine	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Urine	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Salmonella arizona</i>	Selles	<i>Enterobacteriaceae</i>
<b>Bactéries à Gram +</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	<i>Micrococcaceae</i>

ATCC: American Culture Collection.

**Tableau 2.2.** Souches utilisées pour le screening antifongique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* et *Thymus vulgaris*.

Souches fongiques	Origine	Famille
<i>Aspergillus niger</i>	Alimentaire	<i>Trichocomaceae</i>
<i>Candida albicans</i>	Alimentaire	<i>Cryptococcaceae</i>
<i>Fusarium</i> sp.	Alimentaire	<i>Tuberculariaceae</i>
<i>Penicillium</i> sp.	Alimentaire	<i>Trichocomaceae</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alimentaire	<i>Saccharomycetaceae</i>
<i>Verticillium</i> sp.	Alimentaire	<i>Plectosphaerellacea</i>

### 2.1.3. Milieux de cultures et agents chimiques

Suivant les méthodes employées et les souches étudiées, nous avons utilisé des milieux de culture solides, en l'occurrence la Gélose Nutritive (GN) ou Muller-Hinton (MH) pour les bactéries et la gélose Sabouraud-Chloramphénicol (SAB) pour les champignons. Tous ces milieux de culture proviennent de la société Idéal-Labo, sise à Beni Mered (Blida).

Afin de mener une étude comparative du pouvoir antibactérien entre l'HE et des produits de références, nous avons utilisé des disques Antibiotiques (ATB) comme contrôle positif. Les ATB utilisés sont: Gentamicine (CN, 10µg). Ces ATB proviennent de la société Bio-Rad (France).

Cependant et concernant les souches fongiques, aucune étude comparative n'a été possible pour cause de non disponibilité des disques antifongiques. De ce fait, nous étions contraints de les remplacer par une solution antiseptique d'Hexomédine à 0.1% (Biopharm, Alger) comme contrôle positif.

Le solvant Tween 80 a été utilisé pour la dilution de l'HE dans un milieu gélosé afin de déterminer la CMI. Ce solvant est pur chimiquement et provient de Sigma-Aldrich (Allemagne).

#### 1.1.4. Matrice alimentaire

Afin de vérifier l'efficacité antifongique de l'HE dans une matrice alimentaire, nous avons opté pour Orangina. C'est une boisson gazeuse sucrée et fruitée type produite localement (unité Djuaguen, Blida) caractérisé par un pH acide et contenant deux conservateurs antimicrobiens de synthèse (SIN202 : Sorbate de potassium et SIN211 : Benzoate de sodium) et un antioxydant/conservateur (SIN300 : Acide citrique).

### 2.2. Méthodes

#### 2.2.1. Elaboration des profils chromatographiques

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse, à régulation électronique de pression, de type Hewlett Packard (série HP 6890, Palo Alto, Californie, USA), équipé d'une colonne capillaire HP-5 (30 m x 0.25 mm) avec une épaisseur de film de 0.25 µm, d'un détecteur FID réglé à 280 °C et un injecteur *split-splitless* réglé à 250 °C. Le mode d'injection est *split*. Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1.7 mL/min. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison d'une montée de 2 °C/min. L'appareil est piloté par un système informatique de type « HP Chem Station », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

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

L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse (Wiley7, NIST 2002). L'identification des constituants est basée sur la comparaison de leurs spectres de masse (CG/SM) respectifs avec les spectres de la bibliothèque et de la bibliographie (Adams, 2007) et sur la base de calcul des Indices de Kovats (IK). L'indice de rétention ou l'IK d'un composé A est indépendant du débit, de la longueur de la colonne et de la quantité injectée. L'IK d'un composé A dépend de la phase stationnaire et de la température. Les IK sont calculés comme suit :

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

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

**TR c** : Temps de rétention du composé ;

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

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

### **2.2.2. Étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles *in vitro***

La recherche de l'activité antibactérienne et antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis à l'HE. Pour cela, deux méthodes qualitatives (aromatogramme et microatmosphère) et une quantitative (CMI) ont été examinées.

#### **2.2.2.1. Méthode des aromatogrammes = Technique en milieu solide**

Cette méthode utilisée par certains auteurs (**Tyagi *et al.*, 2013**) est la technique que nous avons utilisée pour évaluer, dans un premier temps, l'activité antimicrobienne de l'HE. Elle est basée sur une technique utilisée en bactériologie, l'antibiogramme (**Satrani, 2007**).

Dans cette méthode (**Figure 2.1**), nous avons utilisés des disques de 9 mm de diamètre (Antibiotica-Testblattchen, Schleicher & Schuell, D-3354, Dassel, Allemagne) que nous avons imprégnés d'une certaine quantité d'HE. Le disque sera déposé au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne. L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des disques d'ATB par des extraits aromatiques.

Dans notre étude, nous avons testé l'activité antimicrobienne de l'HE en imprégnant les disques par 3 quantités croissantes à savoir 20, 40 et 60  $\mu\text{L}$  d'HE par disque, séparément. Ceci a été fait dans le but d'apprécier l'action « dose-dépendante » de l'essence sur la croissance des germes microbiens.

Chaque boîte Pétri est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à température adéquate (37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 3 ou 5 jours pour les levures et les moisissures, respectivement). L'essence diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries et champignons croissent sur toute la surface gélosée sauf là où elles rencontrent une concentration d'essence aromatique suffisante qui inhibe leur croissance.

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque et dont le Diamètre de la Zone d'Inhibition (DZI) est mesuré et exprimé en millimètres (mm). Plus le DZI est grand, plus la souche est sensible à l'HE.

Aussi et pour chaque souche microbienne, des contrôles positifs ont été réalisés en appliquant, dans les mêmes conditions citées précédemment, des disques d'ATB qui vont servir comme référence pour pouvoir comparer leur pouvoir antibactérien avec notre échantillon d'HE. A cet effet, plusieurs disques d'ATB ont été utilisés et choisis selon leur disponibilité.

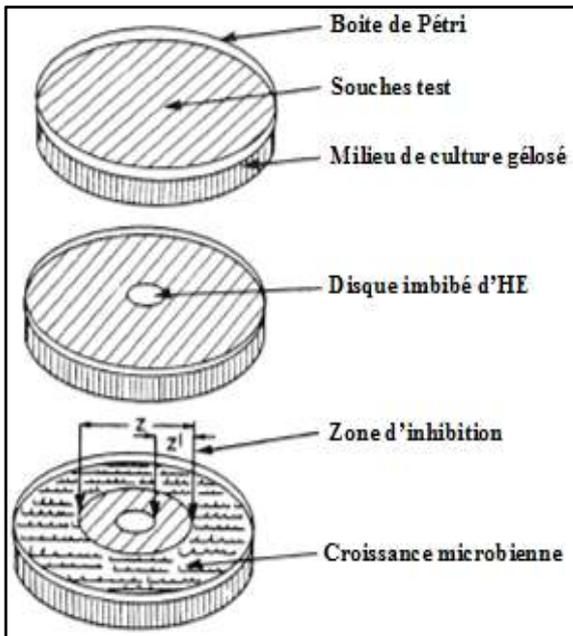
### 2.2.2.2. Microatmosphère = méthode en phase vapeur

Nous avons utilisés cette méthode dans le but d'apprécier les propriétés inhibitrices de la phase volatile de l'HE. Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse sont encore peu nombreux (Tyagi et Malik, 2011).

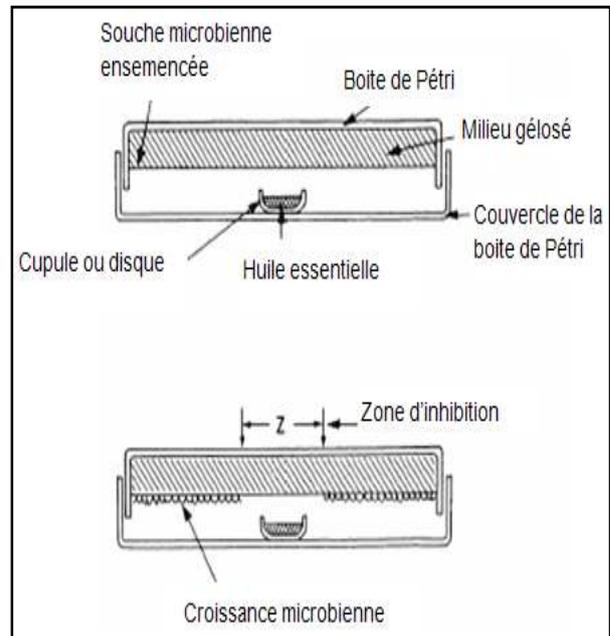
La différence entre cette technique et les aromatoigrammes réside principalement dans la position du disque imprégné. Cette méthode permet de mettre en évidence la diffusion des composants volatils des HE à l'intérieur d'une boîte Pétri.

Le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. De la même manière que l'aromatogramme, nous avons appliqué 3 quantités croissantes au disque. En premier lieu, 20  $\mu\text{L}$  d'huile a été déposée sur un disque de papier filtre de 2 cm de diamètre. Dans le 2<sup>ème</sup> essai, un disque de 4 cm a été imprégné par 40  $\mu\text{L}$  d'HE alors que pour le 3<sup>ème</sup>, un disque de 6 cm a été chargé par 60  $\mu\text{L}$  d'HE. Le diamètre du disque diffère selon la quantité d'HE à imprégner afin d'obtenir un bon étalement de l'essence sur le couvercle et, par conséquent, une meilleure diffusion et évaporation. La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats ont été menés de la même manière que la première méthode (Aromatogramme). La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 72h ou 5 jours pour les levures et les moisissures, respectivement. Il se produit une évaporation des substances qui, en contact avec les microorganismes ensemencés sur la gélose, va inhiber leur croissance. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire.

Une boîte de contrôle, réalisée pour chaque expérience, est une boîte ensemencée dont le disque déposé au centre de la gélose n'est pas imbibé d'HE. Une autre boîte témoin est ensemencée dans les conditions de l'expérience, sans disque. Elle nous renseigne sur l'homogénéité du tapis microbien. A noter que dans ce test, aucun témoin positif n'a été utilisé car les ATB ne sont en aucun cas volatils.



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



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

### 2.2.2.3. Détermination des CMI par dilution en milieu gélosé

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

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte. Une série de dilution de l'HE est préparée avec un intervalle de concentrations qui varie entre 2% à 0,015% pour les bactéries et de 1% à 0,015% pour les levures. L'ensemencement sera fait par touche à l'aide d'un écouvillon stérile. Les boîtes seront incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures.

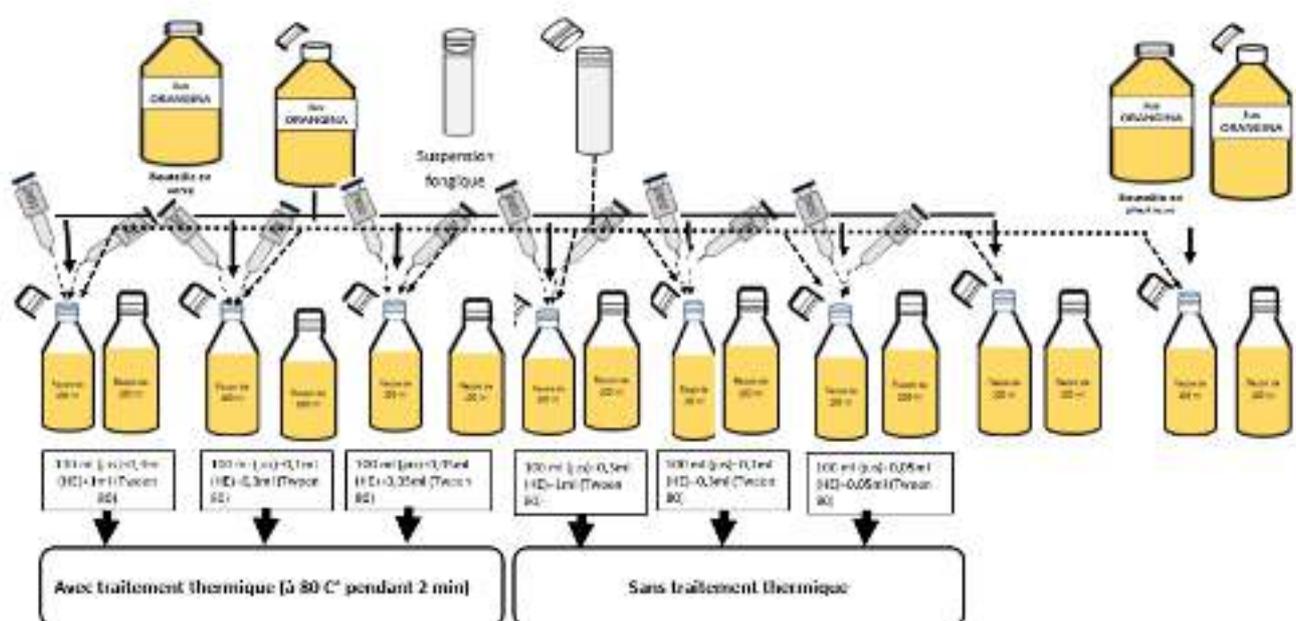
La lecture des résultats se fait visuellement en observant s'il y a l'apparition d'une éventuelle colonie microbienne, en comparaison avec une boîte témoin (exempte d'HE). La CMI se définit comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Le résultat sera exprimé en % (v/v).

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

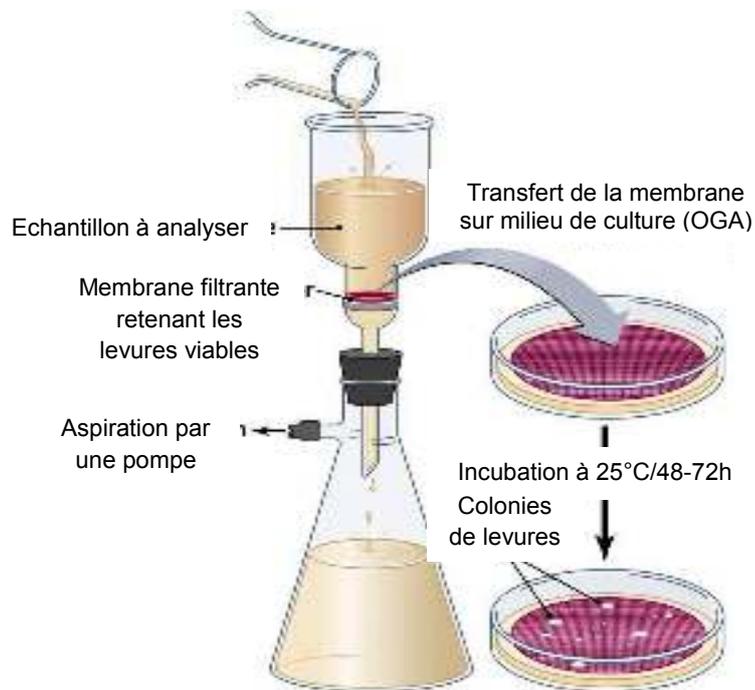
### 2.2.3. Test « Bio-contrôle » : Activité antifongique dans une matrice alimentaire (Orangina®)

L'évaluation de l'activité antifongique de l'HE dans un modèle alimentaire a été réalisée selon la méthode décrite par **Tyagi et al. (2013)**. Nous avons opté pour une boisson gazeuse sucrée et fruitée, type Orangina® (unité Djuguaguen, Blida). De par son pH acide et la présence de deux conservateurs alimentaires (SIN202 : Sorbate de potassium et SIN211 : Benzoate de sodium), ce type de boissons constitue un milieu défavorable pour la croissance bactérienne. Cependant, leur qualité organoleptique peut être altérée du fait de la possibilité d'une croissance fongique, apte à résister aux conditions d'osmophilie et d'acidophilie. C'est la raison pour laquelle nous avons inoculé cette boisson par une souche levuriforme (*S. cerevisiae*) pour apprécier ainsi la cinétique de sa croissance en présence des conservateurs de synthèse, de l'HE seule ou en combinaison avec un traitement thermique.

A cet effet, 3 types de jus Orangina® ont été testés. Le contrôle positif est représenté par un lot de boisson où des conservateurs de synthèse (Sorbate de potassium et Benzoate de sodium) aient été additionnés. Le second lot a été supplémenté de différentes concentrations en HE (0.3%, 0.1% et 0.05%). Le dernier lot va subir une combinaison HE-traitement thermique (80°C pendant 2 minutes) et ce pour apprécier l'effet synergique de ce traitement avec la présence de l'HE pour une meilleure efficacité antifongique dans les boissons fruitées. Ces boissons ont été inoculées préalablement par une suspension fongique de *Saccharomyces cerevisiae*. Par la suite, une dilution décimale a été réalisée ( $10^{-2}$ ) dans l'eau physiologique (NaCl, 0,9%). Ces dilutions vont être analysées par technique de filtration sur membrane (0.45µm, Millipore, USA) afin d'apprécier le niveau de contamination initial. Les membranes filtrantes seront déposées sur gélose SAB et incubées, par la suite, à 25°C pendant 48-72h. La lecture des résultats se résume à dénombrer toute colonie levuriforme. Cette analyse correspond alors à J-0. La même démarche opératoire sera répétée à J-2, à J-4 et J-7 pour les différents lots conservés, entre temps à 4°C, dans le but d'apprécier la cinétique de croissance fongique.



**Figure 2.3.** Illustration du protocole adopté pour le test d'évaluation du pouvoir antifongique dans une matrice alimentaire.



**Figure 2.4.** Illustration de la filtration pour l'analyse microbiologique Jus Orangina®.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.1. Profil Chromatographique des Huiles Essentielles

#### 3.1.1. Composition chimique de l'essence du thym commun

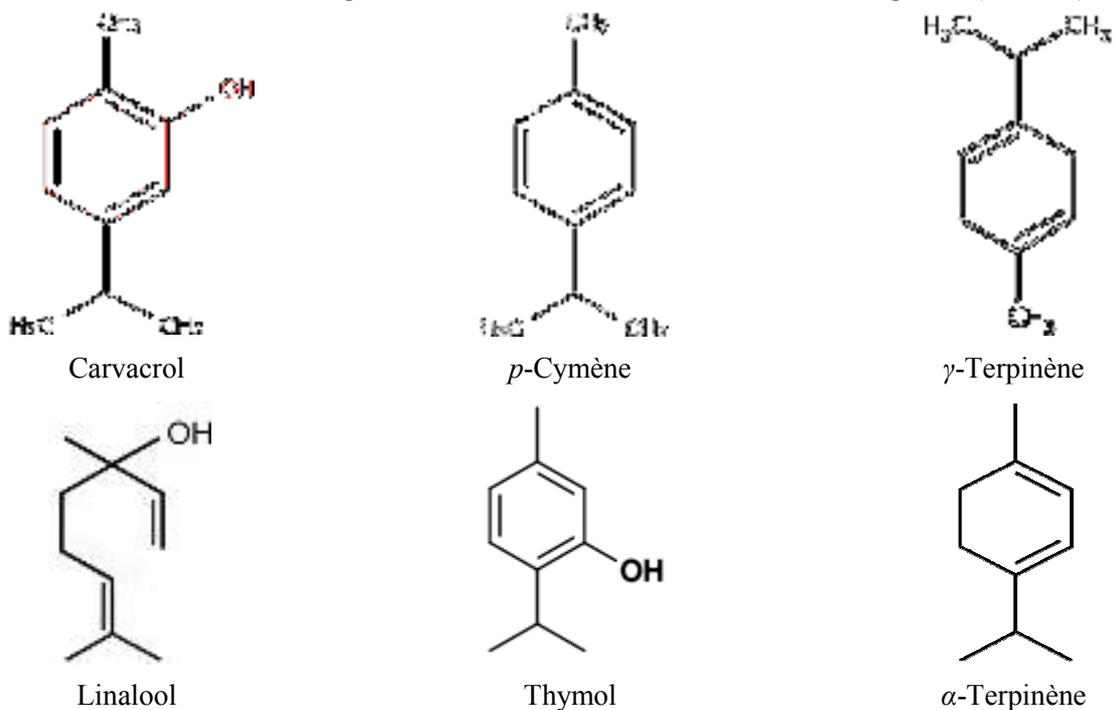
Les résultats de la composition chimique de l'HE de *Thymus vulgaris*, déterminée par CG-SM, sont rapportés dans le **Tableau 3.1** et **Figure 3.2**. Les différents composés ont été listés selon leur Indices de Rétention (IR). Notre étude a été axée sur les composés volatiles majoritaires de l'HE tandis que les molécules, ayant des fragments de masse inférieure à 0.1%, n'ont pas été rapportées.

L'examen de ce tableau montre que l'essence du thym commun étudié est composée majoritairement du carvacrol avec un taux de 83.8% (**Figure 3.1**). D'autre part, la teneur des autres composés varie entre (0.01 – 0.28%) sauf pour le *para*-cymène (8.15%), linalool (1.44%) et le *gamma*-terpinène (4.96%). De plus, la composition du thym, classée par famille biochimique, nous a révélé que cette HE est caractérisé par de très fortes teneurs en monoterpènes oxygénés (85,52%), suivi par les monoterpènes hydrocarbonés (13.5%).

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

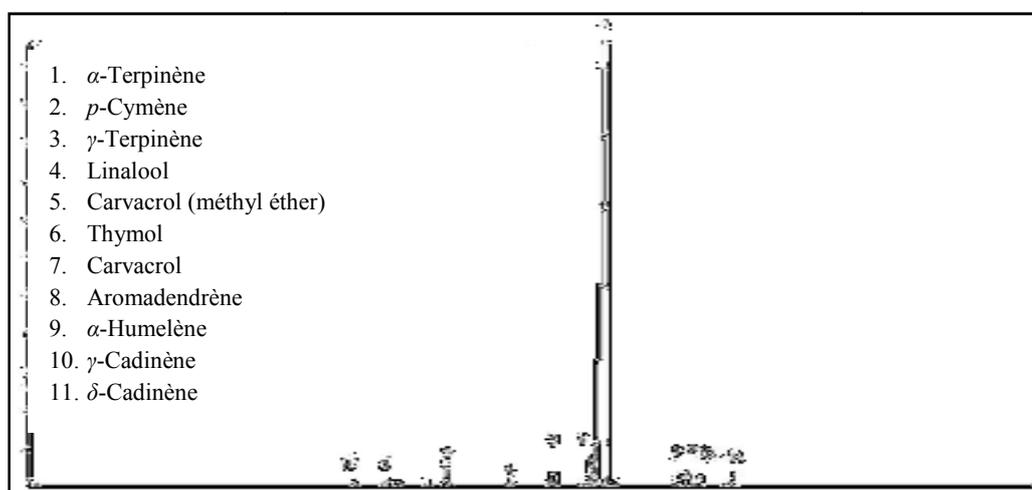
N°	Composés	EVE	IR
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>13,5</b>	
1	$\alpha$ -Terpinène	0,28	1019
2	<i>p</i> -Cymène	8,15	1028
3	<i>trans</i> -Ocimène	0,11	1052
4	$\gamma$ -Terpinène	4,96	1065
<b>Monoterpènes Oxygénés</b>		<b>85,52</b>	
5	Linalool	1,44	1123
6	Terpin-4-ol	0,05	1179
7	Thymol	0,23	1302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

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



**Figure 3.1.** Structure chimique de quelques composés détectés dans l'essence de *T. vulgaris*.

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



**Figure 3.2.** Chromatogramme de l'essence du *T. vulgaris* distillée par entraînement (**Originale, 2017**).

En revanche, d'autres équipes ont rapportés des résultats complètement différents aux nôtres (**Tableau 3.2**) où la principale caractéristique de l'HE de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée en thymol (**Perinaet al., 2014 ; Zeljkovićetal., 2015 ;Nabavi et al., 2015**). D'après **Pavelaet al. (2009)**, les analyses ont montré que les substances majoritaires pour *T. vulgaris* étaient le thymol (60.3%) et le *p*-cymène (10.1%). Les hydrocarbures sesquitépéniques ne représentent qu'un faible pourcentage (1.7%). **Pino et al. (1997)** ont rapporté avoir extrait un échantillon caractérisé par un fort taux de thymol (34.6 %),  $\gamma$ -terpinène (17.6 %) et *p*-cymène (17.6 %). En revanche, ils diffèrent de ceux publiés par **Naguib (2002)**, dont l'essence se caractérise plutôt par une forte teneur en thymol (36.6 %),  $\alpha$ -thujone (23.2 %) et 1,8-cinéole (13.4 %). **Porte et Godoy (2008)** ont signalé également que le thymol (44.77%), *p*-cymène (18.6%) et  $\gamma$ -terpinène (16.5%) sont des substances majoritaires de *Thymus vulgaris* cultivé au Rio de Janeiro (Brésil). Par ailleurs, une équipe Polonaise (**Szczepanik et al.,2012**) a établi la prédominance du thymol dans l'essence de thym commun avec un taux de 57%, alors que le carvacrol a été retrouvé minoritaire (2%), ce qui semble être en totale discordance avec nos résultats.

**Tableau 3.2.** Principaux composés dans l'essence de *T. vulgaris* provenant de différents écosystèmes.

Auteurs (année)	Pays	Principaux composés (majoritaire et caractéristique)
<b>Pina-Vaz et al. (2004)</b>	Portugal	▪ carvacrol (70.3%), <i>p</i> -cymène (11.7%), $\gamma$ -Terpinène (3.2%), linalool (2.2%), thymol (0.6%)
<b>Sacchetti et al. (2005)</b>	Italie	▪ <i>p</i> -cymène (15.3%), géraniol (8%), thujone (7.3%), $\gamma$ -terpinène (5.6%)
<b>Yahyazadeh et al. (2008)</b>	Iran	▪ thymol (46%), <i>p</i> -cymène (17.6%), $\gamma$ -terpinène (14.8%)
<b>Imelouane et al. (2009)</b>	Maroc	▪ camphre (39.39%), camphène (17.57%), $\alpha$ -pinène (9.55%), 1,8-cinéole (5.57%), bornéol (5.03%), $\beta$ -pinène (4.32%)
<b>Kloucek et al. (2009)</b>	République de Tchèque	▪ thymol (42.5%), <i>p</i> -cymène (29.5%) ▪ linalool (58%), thymol (15.2%)
<b>Miladi et al. (2013)</b>	Tunisie	▪ thymol (41.33%), <i>p</i> -cymène (18.08%), and $\gamma$ -terpinene (13.12%)
<b>Abedini et al. (2014)</b>	Iran	▪ carvacrol (57.3 %), linalool (11.8 %), thymol (10.67 %).
<b>Sidali et al. (2014)</b>	Algérie	▪ carvacrol (55.2%), $\gamma$ -terpinene (12.6%), <i>p</i> -cymène (9.3%), linalool (3.9%), $\alpha$ -terpinene (2.8%)
<b>Grespan et al. (2015)</b>	Brésil	▪ carvacrol (45.5%), $\alpha$ -terpineol (22.9%), endo-borneol (14.3%)
<b>Rus et al. (2015)</b>	Roumanie	▪ <i>p</i> -cymène (32.9%), carvacrol (20%), $\gamma$ -terpinène (14.3%), thymol (3.3%)
<b>Kohiyama et al. (2015)</b>	Brésil	▪ bornéol (40.6), camphene (12.3), carvacrol (6.4), $\alpha$ -pinène (6.1)
<b>De Carvalho et al. (2015)</b>	Brésil	▪ thymol (43.2%), <i>p</i> -cymène (28.5%), $\gamma$ -terpinène (6.36%), linalool (5.57%), carvacrol (3.14%).
<b>Guerra-Boone et al. (2015)</b>	Mexique	▪ <i>p</i> -cymène (37%), $\gamma$ -terpinène (20%), thymol (17%), carvacrol (4.9%)
<b>Varga et al. (2015)</b>	Roumanie	▪ thymol (32.2%), <i>p</i> -cymène (21.7%), $\gamma$ -terpinène (13%), carvacrol (5.1%), linalool (3.4%)
<b>Deletre et al. (2015)</b>	France	▪ thymol (30.5%), <i>p</i> -cymène (23.7%), carvacrol (13.6%), $\alpha$ -terpinène (8.4%), linalool (4%)

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *T. vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). L'hybridation facile de l'espèce mène à une grande variabilité intra-spécifique, qui affecte l'homogénéité du rendement d'extrait et sa composition en produits chimiques (Al-Tawaha *et al.*, 2014 ; Nabavi *et al.*, 2015)

### 3.1.2. Détermination de la composition chimique de l'essence de lavande papillon

Notre étude s'est axée sur la détermination des composés volatiles majoritaires de l'HE alors que les molécules ayant des fragments de masse inférieure à 0.05% n'ont pas été rapportées.

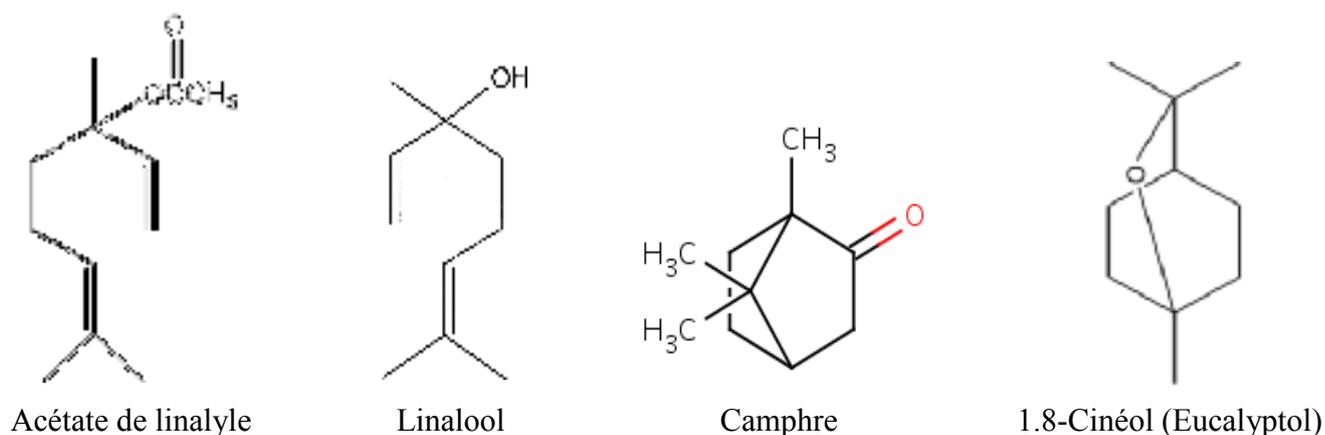
L'huile essentielle de *Lavandula stoechas*, obtenue à échelle industrielle par entraînement à la vapeur d'eau sous pression, a été d'abord analysée par Chromatographie Gazeuse avec un Détecteur d'ionisation à Flamme (GC-FID) sur une colonne capillaire apolaire HP5-MS (Figure 3.2). Pour une identification plus exhaustive des composés aromatiques, l'essence aromatique a été analysée, par la suite, avec Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC/MS) sur une colonne capillaire apolaire (HP5-MS). Les conditions opératoires sont détaillées dans la partie expérimentale. Le Tableau 3.2 donne, dans l'ordre d'élution, les compositions, qualitative et quantitative, de l'essence de lavande papillon distillée et regroupées selon les familles terpéniques. Au total, vingt-trois (23) composés ont été détectés. Pour l'identification, nous avons d'abord calculé leurs IR ; ensuite nous les avons comparés à ceux de la littérature. Nous avons, par la suite, procédé au dépouillement de leurs spectres de masse en se référant à ceux donnés dans les différentes bibliothèques (NIST et Wiley).

A la lecture des résultats consignés dans le Tableau 3.2, il apparaît clairement que l'acétate de linalyle apparaît comme le composé majoritaire de l'essence de la lavande à toupet avec un taux de 36.67%, suivi par le linalool avec 33.42%, le camphre (6.38%) et le 1.8 cinéol (4.86%) (Figure 3.4). Les autres composés sont présents avec un taux inférieur à 3%. D'un point de vue biochimique, la famille des monoterpènes oxygénés, représentée par les alcools et leurs esters, est la plus abondante avec un taux supérieur à 90%. Un seul sesquiterpène a été détecté dans l'essence de lavande, en l'occurrence le caryophyllène, mais qui demeure quasi-inexistant (0.12%).

**Tableau 3.2.** Composition chimique de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* distillée, à échelle industrielle, par entraînement à la vapeur sous pression.

N°	Composés	IR	%
<b>Monoterpènes</b>			<b>00,46</b>
1	$\alpha$ -Pinène	926	00,16
2	Camphène	942	00,20
3	$\beta$ -Pinène	974	00,10
<b>Monoterpènes Oxygénés</b>			<b>51,09</b>
4	1,8-Cinéole	1088	04,86
5	<i>Cis</i> -Oxyde de Linalool	1102	01,35
6	<i>Trans</i> -Oxyde de Linalool	1116	01,12
7	Linalool	1123	33,42
8	1-Acétate d'Octen-3-yl	1130	00,46
9	Camphre	1149	06,38
10	Bornéol	1173	02,50
11	Butyrate d'Hexyl	1201	01,00
<b>Sesquiterpènes</b>			<b>00,12</b>
12	E-Caryophyllène	1425	00,12
<b>Sesquiterpènes Oxygénés</b>			<b>01,54</b>
13	Oxyde de Caryophyllène	1570	01,23
14	$\alpha$ -Bisabolol	1684	00,31
<b>Autres Composés Oxygénés</b>			<b>40,57</b>
15	3-Octanone	989	00,65
16	N-Acétate d'Hexyl	1022	00,45
17	N-Hexyl 2-MéthylButyrate	1234	00,13
18	Acétate de Linalyl	1277	36,67
19	Acétate de Bornyl	1285	00,28
20	Acétate de Lavandulyl	1295	01,78
21	Tiglate de Hexyl	1345	00,31
22	Acétate de Néryl	1372	00,06
23	Acétate de Géranyl	1394	00,24

IR : Indice de Rétention calculé sur une colonne apolaire (HP5-MS)



**Figure 3. 3.** Structure chimique des composés majoritaires détectés dans l'essence de *L. stoechas*.

Toutes les espèces et les hybrides du genre *Lavandula* sont des plantes très aromatiques qui produisent des mélanges complexes d'HE produites et stockées dans des glandes sur la surface des fleurs et des feuilles (**Lis-Balchin, 2002**). Il n'est donc pas surprenant que les connaissances phyto-chimiques sur les lavandes soient axées sur leurs molécules terpéniques.

Les études sur la composition chimique des HE des espèces du genre *Lavandula* montrent qu'elles sont plus riches en monoterpènes qu'en sesquiterpènes et que ces deux groupes de molécules constituent la majeure partie des HE (**Tableau 3.3**) (**Benabdelkader, 2012**). Ceci paraît en conformité avec nos résultats obtenus où les monoterpènes oxygénés sont majoritaires (90%). Les études des constituants volatils des espèces de lavande ont révélé la présence de plus de 200 constituants chimiques, beaucoup d'entre eux étant présents sous forme de traces. Certaines espèces telles que *Lavandula stoechas* synthétisent plus de 100 terpènes différents alors que d'autres espèces telle que *L.canariensis* expriment une diversité terpénique beaucoup plus faible. *L. stoechas* a été plus particulièrement étudiée du fait de son aire de répartition large et de son utilisation traditionnelle très ancienne (**Cavanagh & Wilkinson, 2006, Benabdelkader, 2012**).

A la lecture des résultats comparatifs rapportés dans le **Tableau 3.3.**, il apparaît que *L. stoechasa* été étudiée dans différents pays méditerranéens (Crète, Espagne, Corse, Chypre, Grèce, Turquie, Maroc, Algérie et Tunisie) avec des résultats différents. Ces variations sont soit qualitatives (composés différents) soit quantitatives (proportions différentes de certains composés). Ces changements peuvent parfois être dus à des différences climatiques, géographiques ou saisonnières ou simplement à la quantité d'arrosage ou la fertilisation utilisée. Elles peuvent également avoir une origine génétique. Finalement, ces variations peuvent être également attribuées aux méthodes d'extraction des HE et, dans le cas des essences commerciales, au degré de mélange et de falsification (**Lis-Balchin, 2002**).

En accord avec les résultats obtenus lors de notre étude, les HE extraites des populations de *L.stoechas* sont reconnues pour la complexité de leur composition chimique et la variabilité de leurs constituants. Si 1 à 3 composés sont majoritaires, elles renferment en parallèle un très grand nombre d'autres molécules, souvent présentes à l'état de traces. Des travaux antérieurs à la présente étude ont porté sur la variation de la composition chimique des HE de *L. stoechas* de différentes régions méditerranéennes(**Tableau 3.3**). Nos résultats semblent être en désaccord avec ceux obtenus sur d'autres populations nord Africaines et du reste du bassin méditerranéen. Ces études ont révélé l'existence de plusieurs chémotypes. Le chémotype le plus décrit de *L. stoechas* est le celui du fenchone/camphre enregistré au Maroc (**Zrira & Benjilali, 2003**), en Tunisie (**Bouzouita et al., 2005**), en Italie (**Angioni et al., 2006**), en Crète (Grèce) (**Skoula et al., 1996**), à Chypre (**Valentini et al., 1993**) et en Corse (France) (**Ristorcelli et al., 1998**).

**Tableau 3.3.** Composés chimiques majoritaires détectés dans l'essence aromatique des lavandes papillons (*Lavandula stoechas*) provenant de différentes localisations géographiques.

Espèce	Origine	Organe	Composés majoritaires (%)	Auteurs
<i>L. stoechas</i> ssp. <i>stoechas</i>	Rabat (Maroc)	Partie aérienne Fleurie	Fenchone = 30 Camphre = 18 1.8-cinéol = 8	<b>Valentini et al.</b> (1993)
	Chypre	Partie aérienne Fleurie	Fenchone = 28-51 Camphre = 4-39	
<i>L. stoechas</i>	Crète	Feuilles et Fleurs	Fenchone = 44-48 1.8-cinéol = 5-16 Camphre = 4-6 Acétate de myrtényle = 2-9	<b>Skoula et al.</b> (1996)
<i>L. stoechas</i>	Corse (France)	Non spécifié	Fenchone = 14-75 Camphre = 2-56 1.8-cinéol = 3-14 Acétate de myrtényle = 1-4	<b>Ristorcelli et al.</b> (1998)
<i>L. stoechas</i> ssp. <i>luisieri</i>	Séville (Espagne)	Partie aérienne Fleurie	Acétate $\alpha$ -nécrodyde = 17-27 1.8-cinéol = 6-16 Acétate de lavandulyle = 4-5	<b>Lavoine- Hanneguella (2004)</b>
<i>L. stoechas</i> ssp. <i>atlantica</i>	Rabat (Maroc)	Partie aérienne Fleurie	Camphre = 39 Fenchone = 9 Camphène = 7 A-pinène = 6.5	<b>Zrira &amp; Benjlali (2003)</b>
<i>L. stoechas</i>	Kairouan (Tunisie)	Feuilles	Fenchone = 68 Camphre = 11 1.8-cinéol = 5	<b>Bouzouita et al.</b> (2005)
<i>L. stoechas</i>	Cherchell (Algérie)	Feuilles et Fleurs	Fenchone = 31 Camphre = 22 p-cymène = 6	<b>Dob et al.</b> (2006)
<i>L. stoechas</i>	Australie	Fleurs	Camphre = 48 Fenchone = 22 1.8-cinéole = 9 Linalool = 2	<b>Cavanagh &amp; Wilkinson (2006)</b>
<i>L. stoechas</i>	Cagliari (Italie)	Fleurs, feuilles et tiges	Fenchone = 59-72 Camphre = 9-15 Acétate de myrtényle = 3-5	<b>Angioni et al.,</b> (2006)
<i>L. stoechas</i>	Australie	Non spécifié	Camphre = 48 Fenchone = 21 1.8-cinéol = 9	<b>Moon et al.</b> (2007)
<i>L. stoechas</i>	Chalkidiki (Grèce)	Feuilles et Fleurs	Fenchone = 45 1,8-cinéole = 16 Camphre = 10 p-cymène = 5	<b>Hassiotis (2010)</b>
<i>L. stoechas</i>	Tlemcen (Algérie)	Partie aérienne Fleurie	Fenchone = 28 1.8-Cinéole = 19 Camphre = 18	<b>Mohammedi &amp; Atik (2012)</b>
<i>L. stoechas</i> ssp. <i>lusitanica</i>	Algarve (Portugal)	Partie aérienne Fleurie	Camphre = 40 Fenchone = 38	<b>Costa et al.</b> (2013)
<i>L. stoechas</i>	Taroudant. (Maroc)	partie aérienne	Camphre = 44 Camphène = 15 Terpinolène = 13	<b>Khia et al.</b> (2014)
<i>L. stoechas</i>	(Sud Est de L'Espagne)	Partie aérienne Fleurie	Fenchone = 33-37 Camphre = 16-24 Eucalyptol = 17-18	<b>Carrasco et al.</b> (2015)

Dans une autre étude réalisée sur quatre populations sauvages de *L. stoechas* de la Crète, **Skoula et al. (1996)** ont montré que les principaux constituants des HE sont alternativement, ou en combinaison le fenchone, le camphre, le 1,8-cinéol, l' $\alpha$ -pinène et l'acétate de myrtényle. Ainsi, alors que le fenchone était un élément majeur de l'HE de toutes les quatre populations, trois étaient également riches en camphre et la quatrième en 1,8-cinéol. Pour notre échantillon, l'essence analysée de la lavande à toupet paraît être de chémotype acétate de linalyle, avec la présence d'un 2<sup>ème</sup> composé majoritaire, le linalool. Ces deux composés, à eux seuls, représentent un taux de 70%. Un autre monoterpène oxygéné, le 1,8-cinéol, a été retrouvé dans notre échantillon d'essence mais avec un taux très faible (5%). Ceci paraît être en totale contradiction avec d'autres travaux qui révèlent que des populations, ayant un taux élevé de 1,8-cinéol, peuvent également être trouvées dans le nord de l'Afrique. En revanche, tous les chémotypes consignés dans le **Tableau 3.3** diffèrent complètement de celui publié par **Gören et al. (2002)** dont l'HE d'une *L. stoechas*, originaire de Turquie, se caractérisait plutôt par un profil jamais retrouvé et ayant une forte teneur en pulégone (40.4 %), menthol (18.1 %) et menthone (12.6 %), en parallèle avec une absence totale de fenchone et de camphre.

Chez une autre population algérienne de *L. stoechas* (**Dobet et al., 2006**), la présence de quantités élevées de *p*-cymène (6.5 %) a été révélée. D'après la large étude de **Garcia-Vallejo (1990)** menée sur plusieurs populations de plusieurs espèces de *Lavandula* espagnoles et portugaises, l'acétate de myrtényle a été marqué comme composant caractéristique. Notre échantillon est aussi caractérisé par l'absence totale de quelques composés comme le  $\beta$ -phéllandrène, le longifolène et le germacrène D, définis auparavant dans les HE de *L. stoechas*. Cela s'explique probablement par la perte de ces composés lors de la distillation, surtout s'ils sont présents à l'état de traces (**Lis-Balchin, 2002**).

Nos résultats obtenus par CG-SM sont en totale adéquation avec d'autres travaux menés sur des populations algériennes de *L. stoechas* et qui démontrent que ces HE contiennent plus de composés oxygénés que de composés hydrocarbonés. Ces composés sont majoritairement monoterpéniques (**Benabdelkader, 2012**). Les derniers sont caractéristiques des espèces de lavande et constituent des marqueurs chémo-taxonomiques utiles pour distinguer des espèces et même des sous-espèces. Par exemple, *L. stoechas* subsp. *luisieri* est le seul taxon de lavande produisant les monoterpènes irréguliers, le *cis*- et le *trans*- $\alpha$ -nécrodol et l'acétate de *trans*- $\alpha$ -nécrodol (**Baldovini et al., 2005**).

En définitive, la différence de composition constatée entre l'essence de lavande analysée, lors de notre travail, et celle des autres populations à travers le bassin méditerranéen est vraisemblablement liée à une régulation différentielle des divers constituants de l'HE par des facteurs abiotiques et biotiques. De nombreux facteurs externes peuvent influencer la composition chimique de ces métabolites aromatiques. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol sont autant de facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'induire des modifications chimiques (**Lis-Balchin, 2002**). L'influence du procédé d'extraction sur la labilité des constituants des HE explique

que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal (Bruneton, 1999).

### 3.2. Screening antimicrobien de l'huile essentielle du thym commun

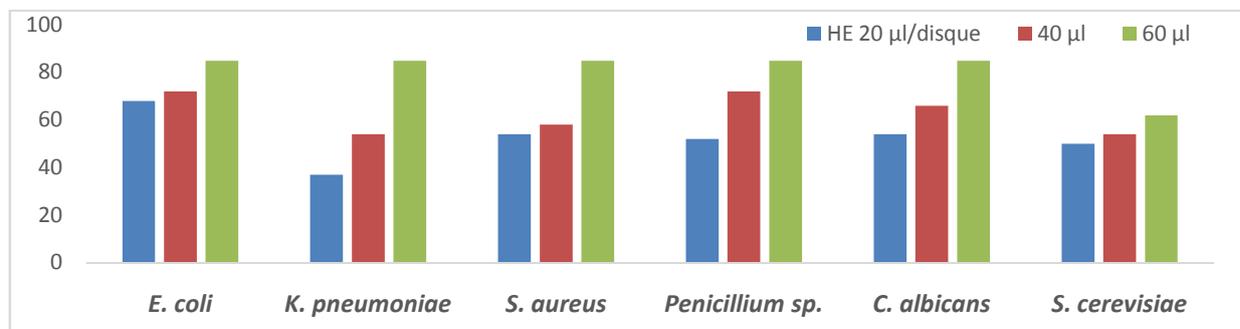
#### 3.2.1. Aromatogramme antibactérien de l'huile essentielle *in vitro*

L'activité antibactérienne de l'essence aromatique du *Thymus vulgaris*, effectuée par 2 méthodes différentes et complémentaires (aromatogramme et microatmosphère), a été testée sur des souches bactériennes de référence (ATCC) ou isolées cliniquement. Les résultats de ce screening sont consignés dans le **Tableau 3.4**. A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul du diamètre de la zone d'inhibition (DZI, mm). Pour ce test, des quantités croissantes en HE ont été utilisées pour apprécier l'action « Dose-Dépendante » de l'essence du thym commun (**Figure 3.5**).

**Tableau 3.4.** Screening antibactérien *in vitro* de l'essence aromatique de *Thymus vulgaris*.

	Méthodes utilisées						Antibiogramme Gentamycine
	Aromatogramme (DZI, mm)			Microatmosphère (DZI, mm)			
	Quantité Huile essentielle (mg/disque)						
	20	40	60	20	40	60	
<b>Souche Gram-</b>							
<i>Escherichia coli</i>	62	68	72	68	72	85	14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	85	85	85	37	54	85	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	14	16	-	-	-	25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	17	26	-	-	-	24
<i>Salmonella arizona</i>	14	16	20	40	56	64	24
<b>Souche Gram +</b>							
<i>Staphylococcus aureus</i>	60	64	85	64	68	85	-

Eu égard des résultats obtenus lors de ce test, nous pouvons affirmer que *K. pneumoniae* est l'espèce la plus sensible à la phase liquide de l'essence avec une inhibition totale (85 mm) à 20 µL d'HE/disque, suivie par un indicateur de contamination fécale, en l'occurrence *E. coli* (62 mm), et le staphylocoque pathogène (60 mm). En revanche, les espèces du genre *Pseudomonas* ont manifesté une résistance totale. A forte concentration en HE (60 µL), *K. pneumoniae* et *S. aureus* ont été inhibées totalement. Ce pouvoir inhibiteur est largement supérieur à celui du contrôle positif (gentamycine) où les DZI signalés ne dépassent pas, dans les meilleurs des cas, 20 mm pour les deux espèces sus-indiquées. Nos résultats semblent être très encourageants pour une éventuelle utilisation de cette essence dans la lutte-prévention des infections cutanées (staphylocoques) ou encore des toxi-infections alimentaires (coliforme thermo-tolérants comme *E.coli*).



**Figure 3.5.** Action antimicrobienne dose-dépendante de l'essence aromatique du thym commun.

Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par **Dorman et Deans (2000)**. Les auteurs de cette étude ont examiné les activités antibactériennes d'HE de poivre noir, de clou de girofle, de noix de muscade, d'origan et de thym contre 25 bactéries de genres différents. L'objectif était également de tenter de déterminer les composants présents dans les HE susceptibles d'être responsables de leur activité antibactérienne. Les résultats ont confirmé ceux de travaux antérieurs et mis en valeur l'activité antibactérienne de ces HE, y compris le thym. En outre, les auteurs de cette étude n'ont détecté aucune relation entre la nature de la paroi et la sensibilité du germe vis-à-vis des HE.

La souche du genre *Pseudomonas* s'est avérée plus résistante à l'HE. Cette résistance n'est pas surprenante. Ceci a été confirmé par plusieurs études antérieures (**Hammer et al., 1999 ; Dorman et Deans, 2000**).

A la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des HE sur les microorganismes : une activité létale (bactéricidie) et une inhibition de la croissance (bactériostase).

L'activité des HE est souvent assimilée à une activité bactériostatique. Cependant les études suivantes ont montré que certains constituants chimiques des HE ont des propriétés bactéricides (**Carson et Riley, 1995**) et fongicides (**Hammer et al., 1999**).

Des composés isolés tels le thymol et le carvacrol rendent la membrane des bactéries perméable, prémices de leur mort (**Lambert et al., 2001**). La faculté de perturber la perméabilité de la cellule membranaire, accompagnée de la perte de l'osmose chimique, sont bien la preuve d'une activité létale de certaines HE (**Cox et al., 2000**).

Par ailleurs, une revue des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) pour 4 variétés de thym portant sur 14 souches bactériennes (dont *Staphylococcus aureus*) a montré que dans la majorité des expériences, les valeurs des CMI sont identiques aux CMB. Ceci indique que les HE incriminées sont bactéricides (**Cosentino et al., 1999**).

### 3.2.2. Aromatogramme antifongique de l'huile essentielle *in vitro*

Les résultats du pouvoir antifongique de l'HE du thym commun en phase liquide sont colligés dans le **Tableau 3.5** et ce en comparaison avec un antiseptique (Héxoméline) prise comme contrôle positif.

Eu égard des résultats obtenus lors de ce screening antifongique, il en ressort que l'HE du thym est fongicide à faible dose (20 µL), en particulier sur les souches mycéliennes car la majorité des espèces ont été inhibées totalement.

Elle présente aussi un fort pouvoir inhibiteur sur les levures avec des DZI qui s'échelonnent entre 45 et 66 mm (faible volume) et entre 75 et 85 mm (forte dose). Il est aussi important de noter que ce pouvoir inhibiteur est largement supérieur à celui du contrôle positif.

**Tableau 3.5.** Screening antifongique *in vitro* de l'essence aromatique de *Thymus vulgaris*.

	Méthodes utilisées								
	Aromatogramme (DZI, mm)			Microatmosphère (DZI, mm)			Antifongigramme		
	Quantité Huile essentielle (mg/disque)						HEX		
	20	40	60	20	40	60	20	40	60
<b>Souches levuriformes</b>									
<i>Candida albicans</i>	45	60	75	54	66	85	22	26	30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66	85	85	50	64	80	28	32	36
<b>Souches mycéliennes</b>									
<i>Aspergillus niger</i>	85	85	85	64	72	85	12	20	28
<i>Fusarium sp</i>	85	85	85	54	70	85	12	20	22
<i>Penicillium sp.</i>	60	65	79	52	72	85	-	-	-
<i>Verticillium sp</i>	85	85	85	85	85	85	-	-	-

DZI = Diamètre de la Zone d'Inhibition ; (-) : absence de zone d'inhibition ; HEX : Solution Héxoméline (Antiseptique)

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

Les résultats obtenus par une équipe Belge (**Manouetal., 1998**) ont suggéré les potentiels applications de l'essence aromatique de *T. vulgaris* comme conservateur antifongique dans des préparations

galéniques dermo-cosmétiques à visée thérapeutique. En effet, il a été observé que les crèmes dermiques, contenant l'essence du thym comme conservateur, ont présenté une bonne stabilité microbiologique dans le temps et une bonne protection contre les contaminations fongiques liées à *Candida albicans* (Manouet *et al.*, 1998).

Dans notre étude, la composition chimique de l'HE utilisée est dominée par la présence des molécules oxygénées (85.5%). Le principal constituant, le carvacrol, représente à lui seul plus des 3/4 de la quantité totale. Il appartient à la classe des phénols.

Une revue de littérature (Hyldgaard *et al.*, 2012) fait apparaître que les essences aromatiques riches en composés oxygénés sont dotées d'un fort pouvoir antimicrobien. Les phénols sont d'ailleurs reconnus pour exercer un effet plutôt fongicide (Chavan et Tupe, 2014 ; Chaillot *et al.*, 2015 ; Cacciatore *et al.*, 2015).

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

Le mode d'action antimycosique de certaines molécules terpéniques a été décrit dans la littérature. Le carvacrol et le thymol semblent capables d'augmenter la perméabilité membranaire (Lambert *et al.*, 2001). En détruisant la membrane externe des germes pathogènes, ils augmenteraient la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (Helander *et al.*, 1998).

Ainsi, le carvacrol, en augmentant la perméabilité de la membrane, n'entraîne pas une fuite d'ATP mais une fuite de protons, qui provoque la chute de la force protomotrice et, par conséquent, de la synthèse d'ATP. Cette information est confirmée par la mesure du gradient de pH à travers la membrane. Le carvacrol formerait des canaux dans la membrane permettant la fuite des ions (Ultee *et al.*, 2002). En plus de limiter la croissance, le carvacrol est capable d'inhiber la production de toxines microbiennes. Deux hypothèses ont été présentées : soit l'exportation active des toxines hors de la cellule n'est plus possible à cause du manque d'ATP ou de la diminution de la force protomotrice, soit le faible taux d'ATP restant est utilisé par le germe pour survivre (Ultee et Smid, 2001).

Le carvacrol possède aussi un large spectre d'activité, étendu aux germes d'altération alimentaire ou des champignons pathogènes, des levures et des microorganismes pathogènes humains, animaux et végétaux, des biofilms y compris lors de résistance aux ATB. Cette activité a été attribuée à ses effets considérables sur les propriétés structurales et fonctionnelles de la membrane plasmique (Iannitelli *et*

*al.*, 2011 ; Nostro et Papalia, 2011). En outre, l'activité antifongique des HE pourrait également être liée à l'interférence des composants de l'essence dans des réactions enzymatiques de la synthèse de la paroi cellulaire, ce qui affecte la croissance fongique (Carmo *et al.*, 2008). Chalchat *et al.* (1997) ont signalé que les huiles aromatiques endommagent une série de systèmes enzymatiques des moisissures, affectant, de ce fait, la synthèse et la production énergétique des composantes structurales.

Plusieurs auteurs, notamment De Billerbeck *et al.* (2001), Mares *et al.* (2004), Rasooli et Abyaneh (2004) et Sharma et Tripath (2008), ont constaté que les HE peuvent causer des changements morphologiques comprenant l'insuffisance de sporulation, la perte de pigmentation, le développement anormal des conidiophores et la déformation des hyphes.

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

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

### **3.2.3. Pouvoir antibactérien et antifongique en phase vapeur**

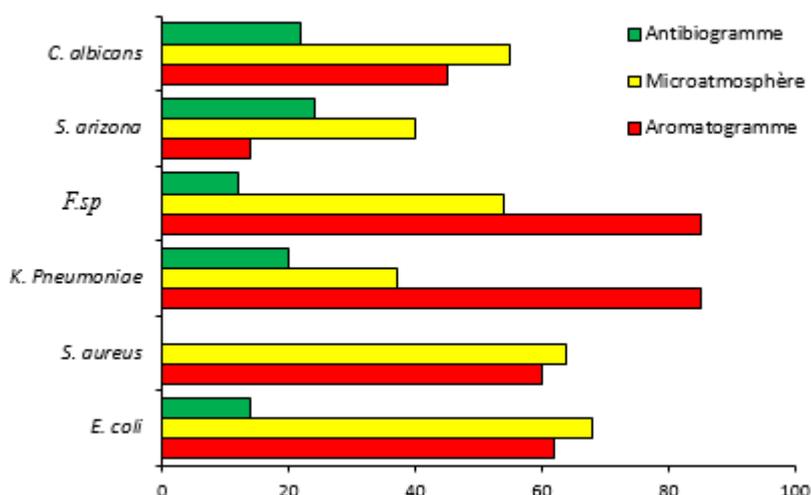
Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait aromatique du thym en phase vapeur sont colligés dans le **Tableaux 3.4** et **3.5**. Pour ce test, des quantités croissantes en HE ont été utilisées pour apprécier l'action « dose-dépendante » de l'essence du thym commun.

*E. coli* et *S. aureus* sont les deux germes les plus sensibles au pouvoir inhibiteur des vapeurs de l'HE avec des DZI de l'ordre de 68 et 64 mm, respectivement, suivi par *S. arizona*. A forte concentration, un effet bactéricide a été obtenu pour *E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. aureus* car ces germes ont été inhibés totalement. En revanche, les espèces du genre *Pseudomonas* demeurent les plus résistantes où aucune zone d'inhibition n'a été constatée et ce pour toutes les doses utilisées.

Concernant le screening antifongique, de meilleurs résultats ont été obtenus en phase vapeur où toutes les souches ont été inhibées totalement à 60 µL en HE par disque. Une action antifongique « dose-dépendante » a été aussi signalée. L'espèce *S. cerevisiae*, un germe largement impliqué dans

l'altération des denrées alimentaires et le changement des propriétés organoleptiques et sensorielles, a présenté une sensibilité importante à l'action inhibitrice de l'HE avec des DZI qui varient entre 50 et 80 mm. De la même façon, cette levure a été inhibée totalement en aromatoigramme. Ces résultats très encourageants, nous ont amenés à approfondir notre étude à travers l'évaluation du pouvoir antifongique de l'HE vis-à-vis de *S. cerevisiae* dans une matrice alimentaire et pouvoir apprécier ainsi son efficacité comme conservateur alimentaire naturel, en comparaison avec des additifs de synthèse. Les résultats de ce travail seront présentés et discutés ultérieurement.

A la lecture de la littérature scientifique, il apparaît que la microatmosphère est très peu documentée. En effet, rares sont les articles qui traitent de cette méthode. Les études réalisées par **Tyagi et Malik (2010, 2011)** ont mis en exergue l'efficacité de la phase vapeur ans l'inhibition de la croissance des germes comparativement à la phase liquide. Ceci a été confirmé notamment sur les Gram+ et les souches fongiques.



**Figure 3.5.** Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle du thym commun :  
Aromatogramme vs Microatmosphère vs Antibioigramme.

Par la même occasion, ces auteurs recommandent l'exploitation de cette propriété pour l'utilisation des HE dans la bioconservation des denrées alimentaires. En phase liquide, l'HE est additionné à une grande concentration pour obtenir l'effet escompté (à savoir la bonne conservation de l'aliment) mais cela sera au détriment des propriétés organoleptiques des denrées qui vont être modifiées voire altérées. Pour y remédier à ce problème, lesdits auteurs préconisent l'usage de l'HE en phase vapeur car une très faible quantité de celle-ci permettra d'avoir l'effet recherché. A titre d'exemple, ils recommandent l'incorporation des HE dans l'emballage et le packaging des aliments. Et puisque l'HE est volatile, donc elle va inhiber et éliminer toute contamination bactérienne et fongique sans le

moindre contact avec aliment ce qui permet de conserver, au même temps, les propriétés organoleptique et sensorielle de l'aliment. Cette constatation à été confirmée par une étude récente(Tyagi *et al.*, 2013)

### 3.2.4. Détermination des Concentration Minimales Inhibitrices

La détermination des CMI a été accomplie uniquement pour les germes ayant montré une grande sensibilité vis-à-vis de l'action inhibitrice de l'HE. Du fait de la non miscibilité des HE dans la gélose, l'incorporation d'un dispersant (Tween 80) a été nécessaire pour une bonne diffusion à travers le milieu gélosé. Par ailleurs, la gamme de dilutions en HE utilisée, lors de cette étude, varient entre 1 à 0.001%. Les résultats de cette analyse sont colligés dans le **Tableau 3.6**.

**Tableau 3.6.**Concentrations Minimales Inhibitrices déterminéespar macrodilution.

Souches microbiennes	CMI (%)
<i>Escherichia coli</i>	0,03
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,03
<i>Salmonella arizona</i>	0,03
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,03
<i>Candida albicans</i>	0,03
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,03

Toutes les levures testées sont très sensibles à l'action inhibitrice de l'HE du thym, avec des valeurs de CMI de l'ordre de 0.03%. Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par d'autres travaux antérieurs (Pina-Vaz *et al.*,2004).Cependant, il est difficile, voire problématique, de faire des comparaisons entre les valeurs des CMI de différentes études. Beaucoup des HE ont la réputation d'être des anti-infectieux efficaces, néanmoins les résultats actuellement publiés sont controversés. Les deux raisons principales sont d'une part la très grande variabilité de la composition chimique des essences du genre *Thymus* et, d'autre part, le manque de fiabilité des méthodes microbiologiques appliquées aux produits insolubles (Hyldgaard, 2012).

Une équipe Française (Giordani *et al.*, 2004) reste, sans conteste, celle qui a le plus travaillé pour valoriser le pouvoir antifongique des extraits aromatiques du thym commun en aromathérapie anti-infectieuse. A défaut d'antifongiques nouveaux et plus puissants, des travaux ont permis de favoriser l'action antifongique de molécules comme l'Amphotéricine B de telle façon que la quantité nécessaire soit inférieure et permette alors d'espérer une diminution des effets secondaires indésirables. Ainsi, Giordani *et al.* (2004) ont montré que l'utilisation des HE de *T. vulgaris*, en concomitance avec les antifongiques de synthèse (Amphotéricine B), pourrait induire une diminution (80% de la CMI initiale) de la quantité de cet antifongique nécessaire à une inhibition de la croissance fongique. Expérimentalement, les HE du thym et de ses hybrides ont fait preuve de leur efficacité antifongique, parfois même supérieure à celle des antifongiques commerciaux (Hussain *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2013 ;Fadli *et al.*, 2012 ; Asdadi *et al.*, 2014 ; Kamdem *et al.*, 2015).

### 3.3. Screening antimicrobien de l'huile essentielle de lavande

#### 3.3.1. Aromatogramme antibactérien de l'huile essentielle *in vitro*

Le screening antibactérien et antifongique de l'essence aromatique de *Lavandula stoechas* a été réalisé, *in vitro*, sur plusieurs souches microbiennes isolées cliniquement. Au total, six bactéries ont été utilisées ainsi que six champignons (2 levures et 4 mycéliums filamenteux (moisissure)). Les résultats de cette étude antimicrobienne sont rapportés dans le **Tableau 3.7**. A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

A la lecture des résultats obtenus en aromatogramme, il apparaît clairement que l'essence de lavande possède une action inhibitrice sur la croissance de tous les germes testés avec une action « dose-dépendante ». A la dose de 20 µL/disque, la souche *S. aureus* demeure le germe le plus sensible avec un DZI de 28 mm, suivi par *E. coli* (24 mm) considéré comme un indicateur de contamination fécale. A forte concentration en HE (60 µL/disque), c'est toujours le staphylocoque pathogène qui a manifesté une grande sensibilité avec un DZI de 56 mm, suivi par *E. coli* (40 mm) et *P. aeruginosa* (34 mm). Il est à noter aussi que cette action antimicrobienne est largement supérieure à la gentamycine (contrôle positif), un antibiotique à large spectre de la famille des aminoglycosides où les DZI obtenus ne dépassent pas, dans les meilleurs des cas, 25 mm.

**Tableau 3.7.** Screening antibactérien *in vitro* de l'essence aromatique de *Lavandula stoechas*.

	Méthodes utilisées						Gentamycine
	Aromatogramme (DZI, mm)			Microatmosphère (DZI, mm)			
	Quantité Huile essentielle (µL/disque)						
	20	40	60	20	40	60	
<b>Bactéries à Gram-</b>							
<i>Escherichia coli</i>	24	32	40	12	36	55	14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	16	18	-	36	42	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	24	34	-	-	-	25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12	14	18	-	-	-	24
<i>Salmonella arizona</i>	12	14	16	-	-	-	24
<b>Bactéries à Gram+</b>							
<i>Staphylococcus aureus</i>	28	40	56	25	44	60	-

DZI = Diamètre de la Zone d'Inhibition ; (-) : absence de zone d'inhibition.

Les résultats de notre screening antimicrobien semblent être en accord avec d'autres travaux indiquant que les HE de populations non-algériennes de *L. stoechas* possèdent également des activités antiseptiques. Il a été rapporté que l'huile volatile de plantes en provenance de Tunisie a une action antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (**Bouzouita et al., 2005**). De même, des activités antibactériennes ont été signalées pour l'HE de *L. stoechas* sauvage de Turquie (**Gören et al., 2002**), d'Italie (**Angioni et al., 2006**) ou à partir de plantes cultivées en Australie (**Moon et al., 2007**).

Dans l'une des larges études dans ce champ, **Deans et Ritchie (1987)** ont analysé cinquante HE, à quatre concentrations, contre une série de 25 genres de bactéries. Dans le cas de la lavande, ils ont révélé qu'elle est largement efficace contre différentes souches, particulièrement contre l'indicateur fécal *Enterococcus faecalis*. Le genre *Bacillus* a été également retrouvé comme étant sensible à l'HE de lavande dans de nombreuses études (**Deans and Ritchie, 1987; Lis-Balchin et al., 1998**). L'étude de **Jeanfilset al. (1991)** a révélé que les propriétés antibactériennes de la lavande dépassent celles de l'*Allium cepia*. En effet, l'HE de lavande a révélé une action sur le *Bacillus stearothermophilus*, un important germe impliqué dans la détérioration des aliments capable de résister aux températures élevées. Ces travaux indiquent que les extraits de lavande possèdent un large spectre bactéricide contrairement aux extraits d'oignons. De plus, les extraits aromatiques de lavande ont une activité prononcée contre les membres du genre *Salmonella*.

Dans notre étude, la composition chimique de l'HE utilisée est dominée par la présence de molécules oxygénées. Les deux principaux constituants, l'alcool (linalool) et son ester l'acétate de linalyle, représentent presque 2/3 de la quantité totale. Ils appartiennent à la classe des monoterpènes oxygénés et leurs structures chimiques sont très proches. Une revue de littérature fait apparaître que les HE riches en alcools possèdent généralement un fort pouvoir antimicrobien. Les alcools sont d'ailleurs reconnus pour exercer un effet plutôt bactéricide que bactériostatique (**Dorman et Deans, 2000**). Dans le travail mené par **Dorman et Deans (2000)**, les alcools terpénoïdes ont montré une activité contre les germes testés, en agissant comme des agents dénaturant les protéines ou des agents déshydratants.

Dans une autre étude, c'est le linalool qui s'est montré le plus efficace avec l'inhibition de 17 bactéries. Il était suivi par le cinéole et le géraniol (chacun d'eux inhibant 16 bactéries), puis par le menthol et le citral qui ont inhibé respectivement 15 et 14 bactéries (**Pattnaik et al., 1997**). De ce fait, le pouvoir antimicrobien de l'essence de la lavande pourra être relié, sans doute, à son profil biochimique caractérisé par la prédominance des composés oxygénés (90%) (**Cavanagh & Wilkinson, 2002**).

Cependant, ces composés ne peuvent être responsables des effets générés par l'HE sur les germes microbiens. **Viljoen et al. (2003)** ont démontré que l'effet synergique peut être actif dans une association entre le 1,8-cinéol et le camphre. Ces deux composés ont été également détectés à faible taux dans notre échantillon aromatique. Cela démontre, sans contestation possible, que la différence d'activité antiseptique des HE ne peut pas s'expliquer par la présence d'un principe actif et, encore moins, par sa seule concentration. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de façon synergique. De cette manière, la valeur d'une HE tient à son « Totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants, et non seulement à ses composés majoritaires. Il se dégage, de ces études expérimentales, que le phénomène « synergie-inhibition » prend ici toute sa valeur démonstrative (**Duraffourd & Lapraz, 2002 ; Goetz & Ghedira, 2012**).

Dans une récente publication, **Yap et al. (2014)** ont voulu démontrer l'efficacité antibactérienne de l'essence aromatique de lavande, en synergie avec un antibiotique, sur une souche multi-résistante : *Escherichia coli*. Cette bactérie fait partie de notre flore intestinale, mais peut induire des pathologies (gastro-entérites, infections urinaires, etc.) La souche *E. coli* était ici résistante à la pipéracilline. Après exposition à l'HE de lavande, les bactéries ont été décimées. L'huile a agi en altérant les membranes externes des bactéries par le biais du « Quorum Sensing » des bactéries. Le quorum sensing est la capacité de bactéries à communiquer avec leurs congénères via des signaux moléculaires. L'étude a donc permis de comprendre le mécanisme d'action antibactérien de l'HE de lavande qui comprend une altération de la membrane externe des bactéries, ainsi qu'une inhibition de leur détection du quorum

Un second essai a porté sur une autre bactérie, *Acinetobacter* sp., responsable de maladies nosocomiales (**Sienkiewicz et al., 2014**). Elle pose de nombreux problèmes en milieu hospitalier du fait de son antibiorésistance, son aptitude de production d'un biofilm et sa capacité de survie sur une surface neutre. L'HE de lavande a été testée en comparaison avec celles de cannellier et de géranium. Elle s'avère moins efficace que les deux autres huiles étudiées, mais cette étude permet de montrer que ces extraits aromatiques pourraient être utilisés en milieu hospitalier pour la désinfection et l'hygiène.

Une autre étude scientifique a analysé le mode d'action antibactérien et anti-inflammatoire de l'huile essentielle de lavande officinale (**Giovannini et al., 2016**). En effet, plusieurs études démontrent ces propriétés mais les chercheurs ont voulu observer sa réponse par rapport à une bactérie particulière, le *Staphylococcus aureus*. Cette espèce est une bactérie présente naturellement chez l'homme mais qui, dans certaines circonstances, peut devenir pathogène. Elle est responsable de maladies nosocomiales et de pathologies dermatologiques. Du fait de sa grande résistance à certains antibiotiques, son traitement est d'autant plus difficile. L'essai a prouvé une action antibactérienne et anti-inflammatoire par la stimulation de la réponse des macrophages. Plus précisément, l'HE de lavande augmente le taux de phagocytes, et stimule le confinement de la réplication bactérienne intracellulaire par les macrophages. Elle permet aussi une répression des cytokines pro-inflammatoires et leurs récepteurs. Le résultat est intéressant, car permettrait de mettre en place des traitements (conjoints à des ATB) contre *S. aureus*.

Dans une autre étude, publiée dans la revue « Journal of Microbiology, Immunology and Infection », l'HE de lavande est associée à deux autres huiles, le giroflier et le géranium odorant (**Panahi et al., 2014**). Les effets de ce mélange ont été comparés à ceux de la ciprofloxacine (antibiotique de la famille des fluoroquinolones). Soixante-dix patients sont divisés en deux groupes : le « contrôle » reçoit des gouttes de ciprofloxacine tandis que le groupe « essai » bénéficie des gouttes du mélange d'HE. Les gouttes sont appliquées deux fois par jour, pendant une semaine. Les résultats sont étudiés par rapport à l'évaluation de la douleur et l'observation de l'évolution des symptômes de l'otite externe (gonflement, œdème, démangeaisons). Il n'y a pas de différence significative entre les résultats des deux groupes, ce qui montre que le mélange d'HE est aussi efficace que l'antibiotique dans le

traitement d'une otite externe. Cependant l'essence de lavande ne peut être administrée qu'à des enfants de plus de 36 mois, à cause du camphre qu'elle contient.

### 3.3.2. Aromatogramme antifongique de l'huile essentielle *in vitro*

Les résultats du pouvoir antifongique de l'HE de lavande en phase liquide sont colligés dans le **Tableau 3.8** et ce en comparaison avec un antiseptique (Héxoméline) prise comme contrôle positif.

Au vu des résultats obtenus, l'HE de lavande est douée d'un fort pouvoir inhibiteur aussi bien sur les souches levuriformes que les isolats mycéliens. A forte concentration en HE, les DZI enregistrés varient entre 34 et 40 mm pour les levures et entre 36 et 70 mm pour les moisissures. *Penicillium* sp. demeure le champignon le plus sensible à l'action inhibitrice avec une DZI de 40 mm alors que le contrôle positif, représenté par une solution antiseptique d'Héxoméline, aucune zone d'inhibition n'a été notée et ce pour les différents volumes utilisés. Le même constat est rapporté pour la souche *Verticillium* sp. Une action « dose-dépendante » a été signalée pour toutes les souches fongiques.

**Tableau 3.8.** Screening antifongique *in vitro* de l'essence aromatique de *Lavandula stoechas*.

	Méthodes utilisées								
	Aromatogramme (DZI, mm)			Microatmosphère (DZI, mm)			Antifongigramme		
	Quantité Huile essentielle (µL/disque)			HEX					
	20	40	60	20	40	60	20	40	60
<b>Souches levuriformes</b>									
<i>C. albicans</i>	24	34	40	20	40	85	22	26	30
<i>S. cerevisiae</i>	22	30	34	-	-	35	28	32	36
<b>Souches mycéliennes</b>									
<i>A. niger</i>	-	35	64	-	-	-	12	20	28
<i>Fusarium</i> sp.	12	16	36	10	24	32	12	20	22
<i>Penicillium</i> sp.	40	48	56	22	44	56	-	-	-
<i>Verticillium</i> sp.	20	40	70	16	40	68	-	-	-

DZI = Diamètre de la Zone d'Inhibition ; (-) : absence de zone d'inhibition ; HEX : Solution Héxoméline (Antiseptique)

Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité antifongique des métabolites terpéniques des lavandes. Nos résultats sont en concordance avec ceux de plusieurs travaux antérieurs (**Angioni et al., 2006 ; Zuzarte et al., 2013**). Le mécanisme d'action des extraits aromatiques sur les souches fongiques n'a pas été totalement élucidé. Cependant, certaines études soulignent que l'action antifongique de ces substances terpéniques est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci, entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (**Cox et al., 2000**). La lyse des cellules de levure a été montrée par la libération de substances absorbant à 260 nm (**Chami et al., 2005**).

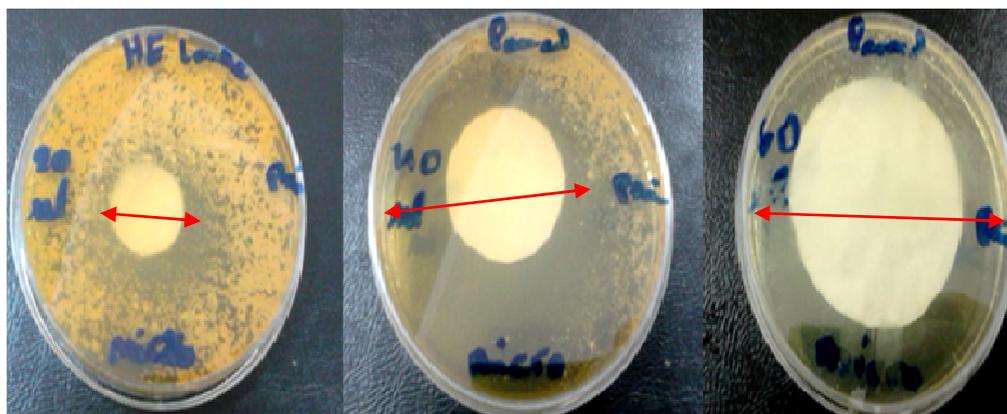
Plusieurs travaux ont mis en exergue les propriétés inhibitrices de plusieurs espèces du genre *Lavandula*, en particulier vis-à-vis des souches *Aspergillus nidulans* et *Trichophyton mentagrophytes* (**Moon et al., 2007**). Cependant, la comparaison de l'efficacité des extraits aromatiques, ou des

constituants individuels, à travers les différentes publications, reste difficile à établir. Cette difficulté réside dans le fait que les paramètres expérimentaux (méthodes employées, conditions physiologiques des germes, dose utilisée) diffèrent entre les études.

### 3.3.3. Pouvoir antibactérien et antifongique en phase vapeur

Contrairement aux résultats obtenus en aromagramme, ceux de la microatmosphère (**Tableau 3.7**) sont peu reluisant car la majorité des bactéries à Gram – ont manifesté une certaine résistance à la phase vapeur, en particulier les germes du genre *Pseudomonas* avec une résistance totale à toutes les doses utilisées. Uniquement le *S. aureus* et *E. coli* qui ont manifesté une certaine sensibilité, en particulier à 60  $\mu$ L, avec des DZI de l'ordre de 60 et 55 mm, respectivement.

En revanche et avec les souches fongiques, de meilleurs résultats ont été obtenus, en particulier pour *Candida albicans* et *Verticillium* sp. où les DZI notée étaient de 40 mm (40  $\mu$ L). A forte dose, *C. albicans* a été inhibé totalement (85 mm), suivi par *Verticillium* sp. (68 mm) et *Penicillium* sp. (56 mm). La souche aspergillaire (*A. niger*) n'a manifesté aucune sensibilité à la phase vapeur, ce qui est en totale contradiction avec la phase liquide.



**Figure 3.4.** Pouvoir antifongique de l'essence en phase vapeur à différentes concentrations.

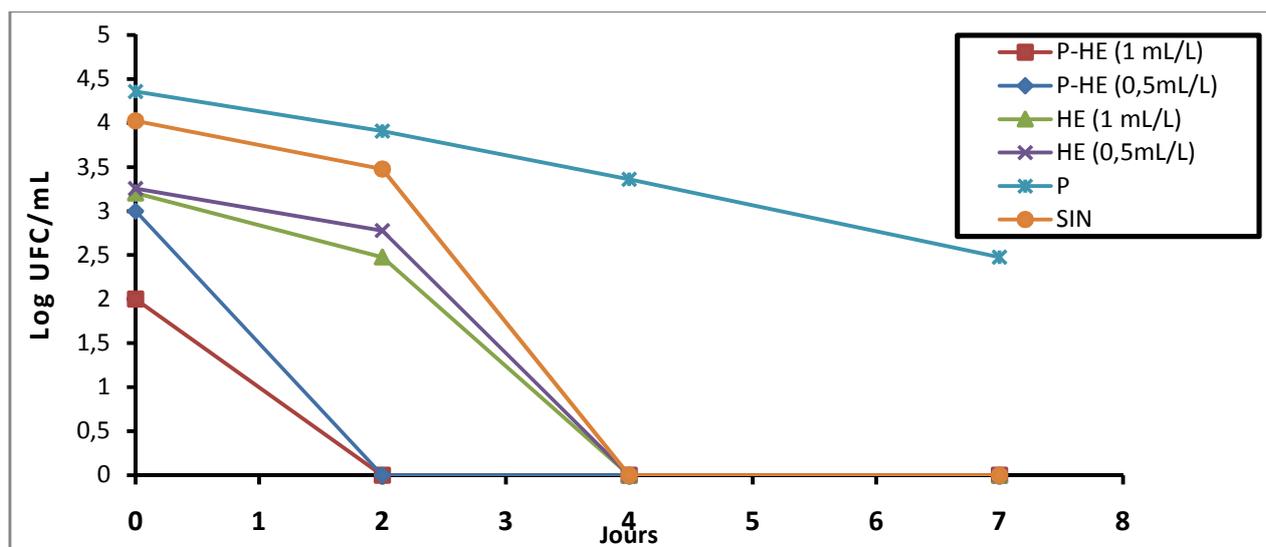
En thérapie, l'essence de lavande pourra trouver une place comme désinfectant atmosphérique en milieu hospitalier afin de lutter contre les infections nosocomiales et les contaminations aéroportées, ainsi que pour le contrôle de l'hygiène de l'air. Bien conduite, la diffusion atmosphérique devient un procédé idéal visant à la protection et à la prévention contre les infections nosocomiales et les pathologies hivernales (**De Billerbeck, 2002 ; Laird et Phillips, 2012**). Rappelons pour mémoire que ce sont les médecins, « parfumeurs et fumigateurs », qui été chargés de la désinfection des locaux et de l'hygiène hospitalière au XVIII<sup>ème</sup> siècle (**Pibiri, 2006**). En plus de leurs actions bactéricide et fongicide, les essences de lavande ont la particularité d'avoir des effets psychophysiologiques bénéfiques (**Lis-Balchin, 2002**).

### 3.4. Activité antifongique de l'essence de thym dans une matrice alimentaire

Eu égard des résultats très encourageants concernant l'action antifongique de l'essence de thym en phase liquide et vapeur, avec une inhibition totale de certaines souches fongique, nous avons essayé de transposé ces résultats dans une matrice alimentaire afin de vérifier ce pouvoir inhibiteur dans une boisson gazeuse sucrée et fruitée type Orangina.

A cet effet, l'essence a été ajoutée au jus pour l'obtention, au final, de plusieurs concentrations de (1 et 0.5 mL/L). Et pour étudier la cinétique de la croissance fongique, nous avons inoculé chaque échantillon par une charge de *Saccharomyces cerevisiae*. En outre, un 3<sup>ème</sup> lot de boisson a été supplémenté en HE suivi par un faible traitement thermique (80°C pendant 2 min). Ceci a été réalisé pour apprécier l'efficacité d'une combinaison HE-traitement thermique sur l'inhibition de la croissance fongique, en comparaison avec du jus conservé uniquement avec de l'HE.

A J-0 et à la lecture des résultats obtenus, une croissance fongique est notée pour tous les échantillons traités avec l'HE où les valeurs Log UFC/mL obtenus varient entre 2 et 3 pour les boissons supplémentées en HE et ayant subi un traitement thermique, alors que ces valeurs sont légèrement supérieures pour les autres lots (Figure 3.5). Cependant et à J-2, une inhibition totale de la croissance levuriforme a été notée pour les lots ayant subi un traitement thermique, en comparaison avec le jus conservés avec des produits de synthèse (benzoates et sorbates) où l'inhibition totale n'a été obtenue qu'au 4<sup>ème</sup> jour de l'expérience. Par contre et pour les boissons ayant été traitées uniquement par un traitement thermique, uniquement une diminution de la charge fongique qui a été notée sans inhibition totale. De ce fait, la pasteurisation seule (80°C/2 mn) demeure insuffisante pour une meilleure conservation des boissons contre les altérations fongiques. Seul les jus traités par une combinaison HE-Pasteurisation qui ont révélé une inhibition totale et rapide de la croissance levuriforme.



HE : Jus supplémenté avec l'Huile essentielle ; P-HE : Jus pasteurisé-huile essentielle ; P : jus pasteurisé ; Sin : Jus avec conservateurs de synthèse.

**Figure 3.5.** Cinétique de la croissance fongique de *Saccharomyces cerevisiae* pour les différents traitements appliqués au jus Orangina.

En définitif, l'HE du thym commun était apte à réduire totalement la croissance fongique à toutes les doses utilisées, seules ou en combinaison avec un traitement thermique. Elle a démontré le bien-fondé de son utilisation comme conservateur alimentaire naturel.

De nombreux produits d'origine végétale sont déjà utilisés dans l'alimentation. Il s'agit principalement de plantes ou d'extraits de plantes, d'épices et d'HE. Parmi tous les produits d'origine végétale, les HE semblent être les plus prometteuses. Pour garder l'image naturelle « green » des aliments, une des possibilités est l'utilisation des HE comme des additifs antimicrobiens. Elles stimulent d'une part l'appétit grâce à leur odeur typique. Elles ont aussi, selon les différentes huiles, des propriétés antimicrobiennes et antiseptiques, certainement dues à un changement de la solubilité des lipides membranaires bactériens. Il a également été démontré *in vitro* que les constituants hydrophobes des HE sont capables de désintégrer les membranes d'*E. coli* ou de *S. typhimurium* (Hyldgaard *et al.*, 2012)

A nos jours, rares sont les travaux qui ont été consacré à l'étude de l'efficacité antimicrobienne des HE dans une matrice alimentaire (Burt, 2004). La majorité des études sont basées sur l'évaluation de cette activité *in vitro*. Dans notre travail et au vu des résultats obtenus, la fraction aromatique du thym commun pourra être recommandée comme antimicrobien naturel, en substitution aux additifs alimentaires chimiques, non dénués d'effet indésirables.

Certains travaux ont confirmé la possibilité d'utiliser les HE pour prolonger la durée de la conservation des aliments. C'est l'exemple d'une étude récente (Tyagi *et al.*, 2013), publié dans « Food Chemistry », qui a rapporté que l'incorporation de l'essence de menthe verte, dans les jus de fruit de pomme préparés d'une façon artisanale, était capable réduire la cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et que cette réduction serait totale en combinaison avec un traitement thermique de courte durée.

Sur le plan économique, la complexité des HE explique actuellement pourquoi les industriels agro-alimentaires ont toujours préféré les composés synthétiques. Ils sont principalement intéressés par la découverte des structures chimiques actives à partir desquelles ils peuvent développer et préparer des analogues synthétiques. Ce sont plus contrôlables du point de reproductibilité, brevetabilité, et sont plus économiquement viables. En conséquence, les différents composants d'HE sont actuellement sous la recherche spécifique pour élucider leur activité particulière (Hyldgaard *et al.*, 2012).

# CONCLUSION

---

Les huiles essentielles et les arômes extraits à partir des herbes aromatiques et des épices sont le résultat d'un mélange complexe de substances volatiles. Ils sont généralement présents à de très faibles concentrations dans les plantes à parfum. L'usage des huiles essentielles, leur efficacité anti-infectieuse a été scientifiquement démontrée *in vitro* et *in vivo* alors qu'on les utilise, de façon empirique depuis des siècles. En aromathérapie scientifique, il s'agit de mettre en valeur les propriétés biologiques en s'appuyant sur la composition de l'huile essentielle.

Eu égard de l'importance de ces huiles en phytothérapie, en particulier celle du thym commun et de lavande papillon, il nous a semblé nécessaire, voire primordial, de consacrer une étude complète pour asseoir leurs activités antibactérienne et antifongique, *in vitro* et dans une matrice alimentaire, en vue de la valoriser comme conservateur alimentaire ou encore comme ingrédient nutraceutique.

Le premier objectif de notre travail était de déterminer la composition chimique des huiles essentielles par analyse chromatographique. L'analyse semi-quantitative a révélé la prédominance des composés oxygénés dans les deux huiles avec la présence des alcools et des phénols comme composés majoritaires.

Une fois l'étape de la caractérisation chimique achevée, un screening antimicrobien des ces huiles a été accompli par deux méthodes complémentaires sur une large gamme de souches microbiennes. C'est l'essence du thym qui a exhibé le plus fort pouvoir antibactérien, comparativement à celle de la lavande où l'inhibition n'a été que partielle voire faible. Dans tous les cas, ces deux huiles aromatiques ont exhibé un pouvoir inhibiteur largement supérieur à l'antibiotique et à l'antiseptique, pris comme contrôle positif. En outre, une action fongicide a été constatée aussi bien en phase liquide qu'en microatmosphère. Une inhibition totale a été signalée pour toutes les souches fongiques ce qui ouvrent des perspectives d'application de cette huile comme ingrédient actif dans des formulations galéniques pour la lutte-prévention des mycoses superficielles.

Par ailleurs, l'efficacité antifongique de l'essence a été vérifiée en l'incorporant dans une matrice alimentaire (jus de fruit gazeifié type Orangina), seule ou en combinaison avec un traitement thermique. L'essence du thym a permis une réduction totale et rapide de la croissance fongique, en comparaison avec le contrôle négatif. Ces résultats sont très encourageants pour une éventuelle utilisation des huiles aromatiques en bioconservation des denrées alimentaires, en substitution aux additifs de synthèse qui ne sont pas dénués d'effets indésirables.

Comme perspectives, il serait intéressant d'apprécier l'action antifongique de cette essence en comparaison avec les composés purifiés afin de confirmer les possibles effets synergiques entre différents composés, majoritaire et minoritaire.

Une approche récente consiste à combiner l'utilisation des métabolites terpéniques avec des antibiotiques. C'est là une nouvelle stratégie pour surmonter les problèmes de résistance et des effets secondaires associés aux médicaments.

En outre, il nous paraît utile de tester l'action antimicrobienne de l'huile sur une large gamme de microorganismes, en particulier des germes multirésistants (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, *Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine) ou ceux impliqués dans les infections nosocomiales, les dermatophytes ou encore des champignons phytopathogènes.

Il serait temps de s'affranchir la barrière *in vitro* et de passer aux études *in vivo*, voire cliniques. Le mode d'action des huiles au niveau cellulaire des germes microbiens a été rarement abordé. De même que la cinétique d'inhibition au cours de la croissance fongique.

L'image positive que véhiculent les produits naturels est un acquis qui ne devra pas occulter l'aspect toxicologique. Il est primordial d'accomplir des investigations approfondies concernant l'aspect cytotoxique des molécules terpénique, *in vitro* et *in vivo*.

Par ailleurs, les propriétés organoleptiques de l'aliment doivent faire l'objet d'une analyse sensorielle afin de limiter, au maximum, les possibles altérations ou changements de ces caractéristiques suite à l'addition des huiles aromatiques.

En définitive, l'objectif premier de notre travail a été atteint *in vitro* puisque nous avons contribué à valoriser la fraction aromatique de deux plantes médicinales Algériennes, thym commun et lavande papillon, comme source potentielle de conservateur antimicrobien alimentaire. L'essence du thym peut constituer les prémisses d'une nouvelle ère d'industrialisation pour un intérêt futur, aussi bien alimentaire que thérapeutique.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Abedini, S., Sahebkar, A., & Hassanzadeh-Khayyat, M. (2014). Chemical Composition of the Essential Oil of *Thymus vulgaris* L. Grown in Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(3), 538-543.
2. Aburjai, T., & Natsheh, F. M. (2003). Plants used in cosmetics. *Phytotherapy research*, 17(9), 987-1000.
3. Abyaneh, M. R., & Rai, M. (2013). *Antifungal Metabolites from Plants*. Springer-Verlag, Allemagne.
4. Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Publishing Corporation, 4<sup>ème</sup> édition, Pennsylvanie, USA.
5. AFNOR. (2000). *Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles*. AFNOR, Paris, France.
6. AFSSAPS. (2008). *Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles*. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, Paris, France. [www.afssaps.sante.fr](http://www.afssaps.sante.fr)
7. Aiache, J. M., Carnat, A. P., Coudert, P., & Teulade, J. C. (2011). Sources actuelles et futures du médicament, *Chimie du médicament: Conforme au programme PAES*. Masson.
8. Al-Tawaha, A., Al-Karaki, G., & Massadeh, A. (2014). Variation of chemical composition, antioxidant and total phenols of essential from thyme (*Origanum syriacum* L.) grown under open field conditions and protected soilless condition. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 8(12), 20-26.
9. Amara, N., Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kaibouche, N., Laissaoui, O., & Boufridi, A. (2017). Applications potentielles de l'huile essentielle de lavande papillon (*Lavandula stoechas* L.) comme conservateur alimentaire naturel. *Phytothérapie*, 1-9.
10. Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4364-4370.
11. Aquino, R. (2002). Arômes méditerranéens pour la réalisation des lignes cosmétiques méditerranéenne. *Journal of Cosmetic Sciences* 53, 321-335.
12. Asdadi, A., Alilou, H., Akssira, M., Chebli, B., & Moutaj, R. (2014). Chemical composition and anticandidal effect of three *Thymus* species essential oils from southwest of Morocco against the emerging nosocomial Fluconazole-Resistant strains. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(11), 16-26.
13. Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21(1), 33-42.
14. Baldovini, N., Muselli, A., Ristorcelli, D., Tomi, F., & Casanova, J. (1998). Variabilité Chimique De *Lavandula Stoechas* de Corse. *Rivista Italiana Eppos*, 9, 773-780.
15. Baldovini, N., Lavoine-Hannequelle, S., Ferrando, G., Dusart, G., & Lizzani-Cuvelier, L. (2005). Necrodane monoterpénoids from *Lavandula luisieri*. *Phytochemistry*, 66(14), 1651-1655.
16. Bardeau, F. (2009). *Les huiles essentielles: Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale*. Fernand Lanore.
17. Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (Eds.). (2010). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press.
18. Baudoux, D. (2000). *L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles*. Douce Alternative, Biarritz France.
19. Belaiche, P. (1979). *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*.
20. Benabdelkader, T. (2012). Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, *Lavandula stoechas sensu lato*, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Thèse de Doctorat en Science, Filière de Biologie. Université Jean Monnet-Saint-Etienne (France) en co-tutelle avec l'École normale supérieure de Kouba (Alger, Algérie)).
21. Blanc, M. (1998). Decontaminating and detoxifying method for domestic sanitation. European Patent No EP 0625913.
22. Bodiou, L., Frère, D., & Mehl, V. (2008). *Parfums et odeurs dans l'antiquité*. Presses universitaires de Rennes.

23. Bouzouita, N., Kachouri, F., Hamdi, M., Chaabouni, M. M., Aissa, R. B., Zgoulli, S., & Lognay, G. C. (2005). Volatile constituents and antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* L. oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 17(5), 584-586.
24. Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Editions Tec & Doc, Paris, éditions médicales internationales, France.
25. Buckle, J. (1992). Aromatherapy. *Nursing Times*, 89(20), 32-35.
26. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
27. Cacciatore, I., Di Giulio, M., Fornasari, E., Di Stefano, A., Cerasa, L. S., Marinelli, L., & Cellini, L. (2015). Carvacrol Codrugs: A New Approach in the Antimicrobial Plan. *PLoS ONE*, 10(4): e0120937.
28. Carmo, E. S., Lima, E. D. O., & Souza, E. L. D. (2008). The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 362-367.
29. Carrasco, A., Ortiz-Ruiz, V., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J. (2015). *Lavandula stoechas* essential oil from Spain: Aromatic profile determined by gas chromatography–mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities. *Industrial Crops and Products*, 73, 16-27.
30. Carson, C. F., & Riley, T. V. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 78(3), 264-269.
31. Carson, C. F., & Hammer, K. A. (2011). Chemistry and bioactivity of essential oils. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, 203-238.
32. Cavanagh, H. M. A., & Wilkinson, J. M. (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research*, 16(4), 301-308.
33. Cavanagh, H. M. A., & Wilkinson, J. M. (2006). Bioactivity of Lavandula Essential Oils, Hydrosols and Plant Extracts. *RIRDC (Rural Industries Research and Development Corporation)*, 1-30. Kingston, Australia.
34. Chaillot, J., Tebbji, F., Remmal, A., Boone, C., Brown, G. W., Bellaoui, M., & Sellam, A. (2015). The monoterpene carvacrol generates endoplasmic reticulum stress in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC-00551.
35. Chalchat, J. C., Garry, R. P., Menut, C., Lamaty, G., Malhuret, R., & Chopineau, J. (1997). Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 9(1), 67-75.
36. Chami, F. (2005). Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo: Application dans la prophylaxie et le traitement de la candidose vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés.
37. Chaumont, J. P., & Millet-Clerc, J. (2011). *Phyto-aromathérapie appliquée à la dermatologie*. <http://www.lavoisier.fr/>.
38. Chavan, P. S., & Tupe, S. G. (2014). Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control*, 46, 115-120.
39. Clarke, S. (2002). *Essential chemistry for safe aromatherapy*. Churchill Livingstone.
40. Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M. L., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 130-135.
41. Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., Almeida, C., Nogueira, J. M., & Romano, A. (2013). Metabolic profile and biological activities of *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco: Studies on the essential oil and polar extracts. *Food Chemistry*, 141(3), 2501-2506.
42. Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170-175.
43. Cserháti, T. (2010). *Chromatography of aroma compounds and fragrances*. Springer.

44. De Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L., & Dargent, R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(1), 9-17.
45. De Billerbeck, V. G., Roques, C., Vanière, P., & Marquier, P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*, 10(3), 248-251.
46. De Carvalho, R. J., de Souza, G. T., da Conceição, M. L., Maganani, M., & de Souza, E. L. (2015). Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiology*, 52, 59-65.
47. Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5(2), 165-180.
48. Derbré, S. (2009). Emploi de la phytothérapie et de l'aromathérapie en prévention et traitement des dermatomycoses. *Actualités Pharmaceutiques*, 48(484), 19-20.
49. Deysson, G. (1978). Organisation et classification des plantes vasculaires. Ed. SEDES et CDVI, Paris 1978, Tome II.
50. Dob, T., Dahmane, D., Agli, M., & Chelghoum, C. (2006). Essential oil composition of *Lavandula stoechas*. from Algeria. *Pharmaceutical Biology*, 44(1), 60-64.
51. Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
52. Dris, R., & Jain, S. M. (Eds.). (2004). *Production practices and quality assessment of food crops: volume 3: quality handling and evaluation* (Vol. 3). Springer.
53. Druilles, J., Chantefort, A., & Huet, M. (1995). La désinfection chimique de l'air: mythe ou réalité?. *Médecine et maladies infectieuses*, 15(8), 421-429.
54. Duraffourd, C., & Lapraz, J. C. (2002). *Traité de phytothérapie clinique: endobiogénie et médecine*. Elsevier Masson.
55. El-Nekeety, A. A., Mohamed, S. R., Hathout, A. S., Hassan, N. S., Aly, S. E., & Abdel-Wahhab, M. A. (2011). Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicology*, 57(7), 984-991.
56. Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Cunha, J. M., Grespan, R., & Cuman, R. K. N. (2012). Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. doi:10.1155/2012/657026
57. Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pagès, J. M., & Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection-bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 19(5), 464-471.
58. Fani, M., & Kohanteb, J. (2017). *In Vitro* antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* essential oil against major oral pathogens. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*.
59. Festy, D. (2008). 100 réflexes aromathérapie: Je me soigne avec les huiles essentielles.+ pratiques,+ efficaces,+ faciles. Nouvelle édition enrichie. Leduc. s Éditions.
60. Festy, D. (2009). *Les huiles essentielles, ça marche!: Tous les bons gestes pour se soigner autrement*. Leduc. s Éditions.
61. Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in food science & technology*, 19(3), 156-164.
62. Franchomme, P., Jollois, R., & Pénoël, D. (1990). *L'Aromathérapie exactement: encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles: fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle*. Roger Jollois Editeur.
63. Garcia-Vallejo, M. C., Garcia-Vallejo, I., & Velasco-Negueruela, A. (1990). Essential oils of genus *Lavandula* L. in Spain. In *Proceedings of the 11th International Congress of essential oils, fragrances and flavours*. New Delhi, India, 12-16 November, 1989 Vol. 4 Chemistry-analysis and structure. (pp. 15-26). Aspect Publishing.
64. Garreta, R. (2007). *Des simples à l'essentiel: de l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales*. Presses Univ. du Mirail.

65. Gilly, G. (1997). Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse: botanique, culture, chimie, production et marché. Editions L'Harmattan.
66. Giordani, R., Hadeif, Y., & Kaloustian, J. (2008). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79(3), 199-203.
67. Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., & Portugal, H. (2004). Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research*, 18(12), 990-995.
68. Giovannini, D., Gismondi, A., Basso, A., Canuti, L., Braglia, R., Canini, A., & Cappelli, G. (2016). *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil exerts antibacterial and anti-inflammatory effect in macrophage mediated immune response to *Staphylococcus aureus*. *Immunological Investigations*, 45(1), 11-28.
69. Giraud-Robert, A. M. (2005). Intérêt de l'aromathérapie dans la prise en charge des hépatites virales. *Phytothérapie*, 3(6), 235-247.
70. Goetz, P. (2007). Aromathérapie en pathologie digestive. *Phytothérapie*, 5(1), 21-24.
71. Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). Introduction à la phytothérapie anti-infectieuse. In *Phytothérapie anti-infectieuse* (pp. 3-14). Springer Paris.
72. Gören, A. C., Topçu, G., Bilsel, G., Bilsel, M., Aydoğmuş, Z., & Pezzuto, J. M. (2002). The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10), 797-800.
73. Grespan, R., Aguiar, R. P., Giubilei, F. N., Fuso, R. R., & Cuman, R. K. N. (2014). Hepatoprotective effect of pretreatment with *Thymus vulgaris* essential oil in experimental model of acetaminophen-induced injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
74. Grosjean, N. (2011). Les huiles essentielles: Se soigner par l'aromathérapie. Editions Eyrolles.
75. Guerra-Boone, L., Alvarez-Román, R., Alvarez-Román, R., Salazar-Aranda, R., Torres-Cirio, A., Rivas-Galindo, V. M., & Pérez-López, L. A. (2015). Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28, 363-9.
76. Hallahan, D. D. L., Callow, J. A., & Gray, J. C. (Eds.). (2000). *Plant trichomes* (Vol. 31). Access Online via Elsevier.
77. Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.
78. Hassiotis, C. N. (2010). Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from *Lavandula stoechas* in Mediterranean region. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4), 493-501.
79. Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590-3595.
80. Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273-292.
81. Hulin, V., Mathot, A. G., Mafart, P., & Dufossé, L. (1998). Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, 18(6), 563-582.
82. Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1827-1836.
83. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3.
84. Iannitelli, A., Grande, R., Di Stefano, A. (2011) Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(8): 5039-51.
85. Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathelet, J. P., Ankit, M., Khedid, K., & El Bachiri, A. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(2), 205-208.

86. Inouye, S., & Abe, S. (2007). Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*, 5(1), 2-4.
87. Jeanfils, J., Burlion, N., & Andrien, F. (1991). Antimicrobial activities of essential oils from different plant species. *Revue de l'Agriculture-Landbouwtijdschrift (Belgium)*.
88. Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.
89. Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2013). La connaissance des huiles essentielles: qualité et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Springer Science & Business Media.
90. Kamdem, M. S., Sameza, M. L., Dongmo, P. M. J., Boyom, F. F., Bakargna-Via, I., Fokou, J. B. H., & Menut, C. (2015). Antiradical, anti-inflammatory and antifungal activities of essential oils of two aromatic plants: *Apium graveolens* (Apiaceae) and *Thymus vulgaris* (Lamiaceae). *Journal of Life Sciences*, 9, 51-64.
91. Khandelwal, K. (2008). Practical pharmacognosy. Pragati Books.
92. Kohiyama, C. Y., Ribeiro, M. M. Y., Mossini, S. A. G., Bando, E., & Machinski, M. (2015). Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food chemistry*, 173, 1006-1010.
93. Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2014). Evaluation of antifungal activity of antimicrobial agents on cheddar cheese. *Packaging Technology and Science*, 27(1), 49-58.
94. Laird, K., & Phillips, C. (2012). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. *Letters in Applied Microbiology*, 54(3), 169-174.
95. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
96. Lardry, J. M., & Haberkorn, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la revue*, 7(61), 14-17.
97. Lavoine-Hanneguelle, S., & Casabianca, H. (2004). New compounds from the essential oil and absolute
98. Lis-Balchin, M. (2006). *Aromatherapy Science: A Guide For Healthcare Professionals*. Pharmaceutical Press.
99. Lis-Balchin, M. (Ed.). (2002). *Lavender: the genus Lavandula*. CRC press.
100. Maffei, M., Chialva, F., & Sacco, T. (1989). Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves. *New Phytologist*, 111(4), 707-716.
101. Mallea, M., Soler, M., Anfosso, F., & Charpin, J. (1979). Activité antifongique d'essences aromatiques. *Pathol. Biol*, 27, 597-602.
102. Manou, I., Bouillard, L., Devleeschouwer, M. J., & Barel, A. O. (1998). Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, 84(3), 368-376.
103. Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E., & Romagnoli, C. (2004). Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological Research*, 159(3), 295-304.
104. Martini, M. C. (2011). Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. <http://www.lavoisier.fr/>.
105. Miladi, H., Slama, R. B., Mili, D., Zouari, S., & Ammar, E. (2013). Essential oil of *Thymusvulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against food-borne pathogens. *Natural Science*, 5(6), 729-739.
106. Mohammedi, Z., & Atik, F. (2012). Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. *Revue «Nature & Technologie»*, n, 35.
107. Moon, T., Cavanagh, H. M., & Wilkinson, J. M. (2007). Antifungal activity of Australian grown *Lavandula* spp. essential oils against *Aspergillus nidulans*, *Trichophyton mentagrophytes*, NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. In: **Approved standard M7-A5**. Fourth Edition. Villanova, Pa: NCCLS; 2000;
108. Nabavi, S. M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., & Nabavi, S. F. (2015). Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food chemistry*, 173, 339-347.

109. Naguib, N.Y., 2002. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) growth, oil quality, yield and chemical composition as affected by of chelated iron and two potassium forms. *Journal of Agricultural Sciences*, **10**(3), 893-918.
110. Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., & Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, **20**(2), 157-160.
111. Nelly, G. (2007). *L' Aromathérapie tout simplement*, éditions.
112. Nostro, A., & Papalia, T. (2012). Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, **7**(1), 28-35.
113. Oliva, M., Carezzano, M. E., Giuliano, M., Daghero, J., Zygadlo, J., Bogino, P., & Demo, M. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. *Plant Biology*, **17**(3), 758-765.
114. Panahi, Y., Akhavan, A., Sahebkar, A., Hosseini, S. M., Taghizadeh, M., Akbari, H., & Imani, S. (2014). Investigation of the effectiveness of *Syzygium aromaticum*, *Lavandula angustifolia* and *Geranium robertianum* essential oils in the treatment of acute external otitis: A comparative trial with ciprofloxacin. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, **47**(3), 211-216.
115. Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., & Zachariah, T. J. (Eds.). (2008). *Chemistry of spices*. CABI.
116. Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M., & Kole, C. R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, **89**(358), 39-46.
117. Pavela, R., Vrchotová, N., & Tríska, J. (2009). Mosquitocidal activities of thyme oils (*Thymus vulgaris* L.) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, **105**(5), 1365-1370.
118. Pekmezovic, M., Rajkovic, K., Barac, A., Senerović, L., & Arsenijevic, V. A. (2015). Development of kinetic model for testing antifungal effect of *Thymus vulgaris* L. and *Cinnamomum cassia* L. essential oils on *Aspergillus flavus* spores and application for optimization of synergistic effect. *Biochemical Engineering Journal*, **99**, 131-137.
119. Perina, F. J., Amaral, D. C., Fernandes, R. S., Labory, C. R., Teixeira, G. A., & Alves, E. (2014). *Thymusvulgaris* essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. *Pest Management Science*, **71**: 1371–1378.
120. Pharmacopée Européenne. (2007). Direction de la Qualité du Médicament & Soins de Santé du Conseil de l'Europe (DEQM), Strasbourg, France.
121. Pibiri, M. C. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Federal Polytechnic Institute, Lausanne, Suisse (infoscience. epfl.ch: thesis-3311).
122. Pina-Vaz, C., Gonçalves Rodrigues, A., Pinto, E., Tavares, C., & Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **18**(1), 73-78.
123. Pino, J. A., Estarrón, M., & Fuentes, V. (1997). Essential oil of thyme (*Thymus vulgaris* L.) grown in Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, **9**(5), 609-610.
124. Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M. J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., & Martinez-de-Oliveira, J. (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, **55**(10), 1367-1373.
125. Porte, A., & Godoy, R. L. (2008). Chemical composition of *Thymus vulgaris* L.(Thyme) essential oil from the Rio de Janeiro state, Brazil. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **73**(3), 307-310.
126. Rai, M. K., & Chikindas, M. L. (Eds.). (2011). *Natural antimicrobials in food safety and quality*. Cabi.
127. Rasooli, I., & Abyaneh, M. R. (2004). Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, **15**(6), 479-483.
128. Raynaud, J. (2006). Prescription et conseil en aromathérapie. Éditions Tec & Doc.
129. Rhayour, K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*.
130. Rhind, J. P., & Pirie, D. (2012). *Essential oils: a handbook for aromatherapy practice*. Singing Dragon.
131. Riaud, X. (2010). *Histoires de la médecine bucco-dentaire*. l'Harmattan.

132. Ristorcelli, D., Tomi, F., & Casanova, J. (1998). <sup>13</sup>C-NMR as a tool for identification and enantiomeric differentiation of major terpenes exemplified by the essential oil of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(3), 154-158.
133. Roux, D., & Catier, O. (2007). *Botanique Pharmacognosie Phytothérapie*. Wolters Kluwer France.
134. Rus, C., Sumalan, R. M., Alexa, E., Copolovici, D. M., Pop, G., & Botau, D. (2015). Study on chemical composition and antifungal activity of essential oils obtained from representative species belonging to the Lamiaceae family. *Plant, Soil and Environment*, 61(7), 297-302.
135. Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91(4), 621-632.
136. **Sallé, J. L. (1991)**. *Le totum en phytothérapie, approche de la phyto-biothérapie*. Edition Frison-Roche, Paris, France.
137. Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Fougrach, H., Bourkhiss, B., & Talbi, M. (2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 146, 85-89.
138. Sayous, D. J., & Chevallier, J. (2008). *La cosmétique bio* (Vol. 10). Editions Eyrolles.
139. Scimeca, D., & Tétou, M. (2005). *Votre santé par les huiles essentielles*. Alpen Editions sam.
140. Seidemann, J. (2005). *World spice plants: Economic usage, botany, taxonomy*. Springer. Springer-Verlag, Londres, Royaume-Uni.
141. Serrato-Valenti, G., Bisio, A., Cornara, L., & Ciarallo, G. (1997). Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany*, 79(3), 329-336.
142. Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3), 337-344.
143. Shiva, M. P., Lehri, A., & Shiva, A. (2002). *Aromatic & medicinal plants: yielding essential oil for pharmaceutical, perfumery, cosmetic industries and trade*. Dehradun: International Book Distributors.
144. Sidali, L., Brada, M., Fauconnier, M. L., & Lognay, G. (2014). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* du Nord d'Algérie. *Phyto Chem & BioSub Journal*, 8(3).
145. Sienkiewicz, M., Głowacka, A., Kowalczyk, E., Wiktorowska-Owczarek, A. & Łysakowska, M. (2014). The biological activities of cinnamon, geranium and lavender essential oils. *Molecules*, 19(12), 20929-20940.
146. Skoula, M., Abidi, C., & Kokkalou, E. (1996). Essential oil variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 24(3), 255-260.
147. Spichiger, R. E. (2002). *Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique*
148. Szczepanik, M., Zawitowska, B., & Szumny, A. (2012). Insecticidal activities of *Thymus vulgaris* essential oil and its components (thymol and carvacrol) against larvae of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). *Allelopathy Journal*, 30(1), 129-142.
149. Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199-1218.
150. Telphon, T., & de Paillette, I. (2003). *ABC des huiles essentielles*. Grancher.
151. Teuscher, E., Anton, R., & Lobstein, A. (2005). *Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et leurs huiles essentielles*. Tec et Doc.
152. Tisserand, R., & Young, R. (2014). *Essential oil safety: a guide for health care professionals* (Vol. 12). Churchill Livingstone, Elsevier Health Sciences, Londres, Royaume-Uni.
153. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2010). Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 65.
154. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126(1), 228-235.

155. Tyagi, A. K., Gottardi, D., Malik, A., & Guerzoni, M. E. (2013). Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through *in vitro* and *in vivo* (real fruit juices) assays. *Food chemistry*, 134(15), 1-4.
156. Ultee, A., & Smid, E. J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 373-378.
157. Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561-1568.
158. Valentini, G., Arnold, N., & Bellomaria, B. (1993). Etude chimique comparative des huiles essentielles de quatre populations de *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* spontanées de Chypre. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 26(4), 289-299.
159. Valnet, J., Ch, D., & Duraffourd, P. (1978). L'Aromatogramme, nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 12.
160. Varga, E., Bardocz, A., Belak, A., Maraz, A., Boros, B., & Horvath, G. (2015). Antimicrobial activity and chemical composition of thyme essential oils and the polyphenolic content of different *Thymus* extracts. *Farmacia*, 63, 3.
161. Viljoen, A., van Vuuren, S., Ernst, E., Klepser, M., Demirci, B., Başer, H., & van Wyk, B. E. (2003). *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2), 137-143.
162. Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R., & Taheri, H. (2008). Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1445-1450.
163. Yap, P. S. X., Krishnan, T., Yiap, B. C., Hu, C. P., Chan, K. G., & Lim, S. H. E. (2014). Membrane disruption and anti-quorum sensing effects of synergistic interaction between *Lavandula angustifolia* (lavender oil) in combination with antibiotic against plasmid-conferred multi-drug-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), 1119-1128.
164. Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.
165. Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.
166. Zeljković, S. Ć., & Maksimović, M. (2015). Chemical composition and bioactivity of essential oil from *Thymus* species in Balkan Peninsula. *Phytochemistry Reviews*, 14(3), 335-352.
167. Zhiri, A., & Baudoux, D. (2005). Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies: aromathérapie scientifique. Luxembourg: Édition Inspir Development.
168. Zhiri, A., & Baudoux, D. (2005). Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies: aromathérapie scientifique. Luxembourg: Édition Inspir Development.
169. Zrira, S., & Benjilali, B. (2003). The constituents of the oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. *atlantica* Br.-Bl. and *L. stoechas* ssp. *stoechas* from Morocco. *Journal of Essential Oil Research*, 15(2), 68-69.
170. Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Benzarti, A., Marongiu, B., & Salgueiro, L. (2013). Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 44, 97-103.

# Annexe I

## Matériel non biologique

### ➤ Appareillage, Verreries et Réactifs

Tableau 1. Appareillages, Verreries et Réactifs.

Appareillages	Verreries et autres	Réactifs et solutions
- Hotte	- Béchers	- Eau physiologique (0.9%)
- Plaque chauffante	- Pince de laboratoire	- Tween 80
- Bec bunsen	- Micropipette	- Gélose Sabouraud +
- Bain marie	- Pied à coulisse	Chloramphénicol
- Etuves	- Anse de platine	- Muller-Hinton (MH)
- Incubateur	- Flacons stériles	- Gélose nutritif (GN)
- Portoir de tubes à essai	- Disques vierges (9 mm)	- Solution Héxoméline
- Réfrigérateur	- Boîtes Pétri stériles	(0.01%)
- Balance de précision	- Pipettes Pasteurs	
- Rampes filtrante	- Ecouillons stériles	
- Microscope optique	- Tubes à essai stériles	
	- Lame et lamelle	
	- Seringues	
	- Membrane filtrante	

## Annexe II



**Figure 01.** Incubateur à 25°C **Figure 02.** Incubateur à 37°C  
(Originale, 2017). (Originale, 2017).



**Figure 03.** Ramps filtrante **Figure 04.** Membranes filtrante  
(Originale, 2017). (Originale, 2017).

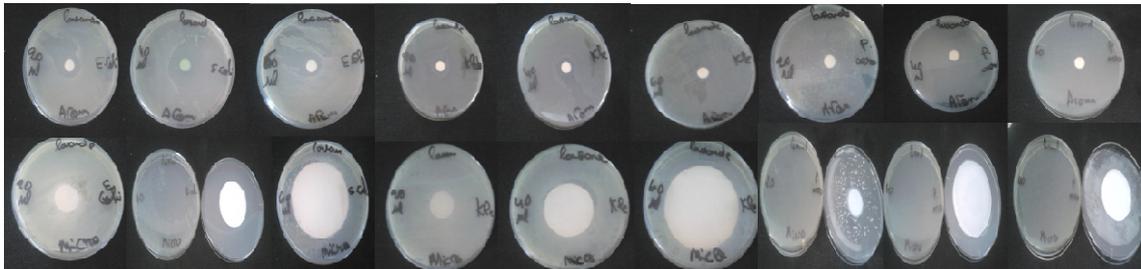


**Figure 05.** Bouteille de jus Orangina en vert **Figure 06.** Bouteille de jus Orangina en  
(Originale, 2017). Plastique (Originale, 2017).

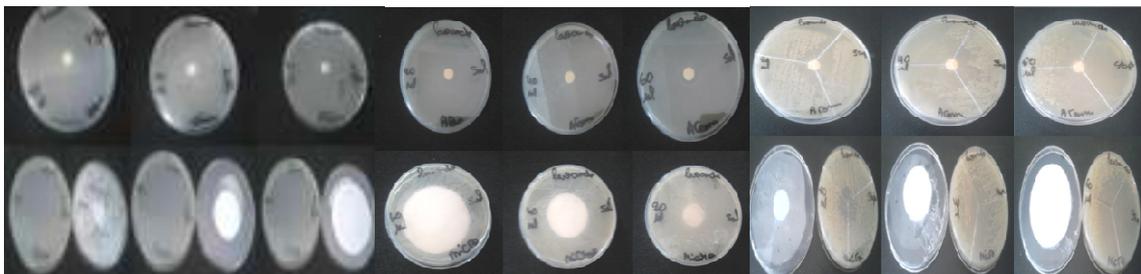


## Annexe III

### ➤ Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas L.*



*Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* *Pseudomonas aeruginosa*



*Pseudomonas fluorescens* *Salmonella arizona* *Staphylococcus aureus*

**Figure 07.** Zones d'inhibitions de la croissance de souches bactériennes testées vis-à-vis d'huile essentielle de *Lavandula stoechas L.* (Originale, 2017).

### ➤ résultats de l'activité antifongique de *lavandula stoechas*



*Aspergillus niger*

*Candida albicans* *Fusarium sp.*



*Penicillium sp.* *Saccharomyces cerevisiae* *Verticillium sp.*

**Figure 08.** Zones d'inhibitions de la croissance de souches fongiques testées vis-à-vis d'huile essentielle de *Lavandula stoechas L.* (Originale, 2017).

➤ Résultats de l'activité antibactérienne de HE *thymus vulgaris*



*Escherichia coli* *Klebsiella pneumonia* *Pseudomonas aeruginosa*

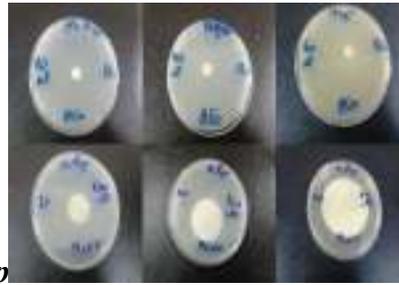


*Pseudomonas fluorescens* *Salmonella arizona* *Staphylococcus aureus*

**Figure09.** Zones d'inhibitions de la croissance de souches bactériennes testées vis-à-vis d'huile essentielle de *Thymus vulgaris L.* (Originale, 2017).

➤ résultats de l'activité antifongique de *Thymus vulgaris*





*Aspergillus niger* *Candida albicans* *Fusarium sp*

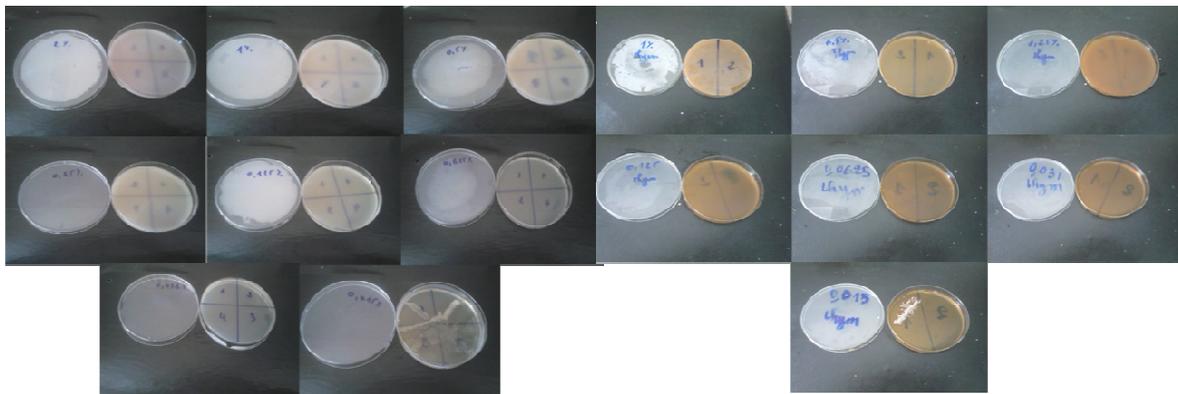


*Penicillium sp* *Saccharomyces cerevisiae*

*Verticilium sp*

**Figure10.** Zones d'inhibitions de la croissance de souches fongiques testées vis-à-vis d'huile essentielle de *Thymus vulqaris L.* (Originale, 2017).

➤ **Résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris L.***



**Figure11.** Concentrations minimales inhibitrices de HE de *Thymus vulgaris L.* vis-à-vis inhibitrices des huiles essentielles de des bactéries testées (Originale, 2017). **Figure 12.** Concentrations minimales de HE de *Thymus vulgaris L.* vis-à-vis des champignons testées (Originale, 2017).

➤ **Résultat de teste « Biocontrôle » : activité antifongique dans une matrice alimentaire**



Avec traitement (300, 100, 50 µl)



Sans traitement (300, 100, 50 µl)



Témoin positif      Témoin négatif

**Figure 13.** Résultats de l'évaluation de l'activité antifongique sur une matrice alimentaire ( $J_0$ ) (Originale, 2017).



Avec traitement (300, 100, 50µl)



Sans traitement (300 10050µl)



Témoin positif      Témoin négatif

**Figure 14.** Résultats de l'évaluation de l'activité antifongique sur une matrice alimentaire ( $J_2$ )(Originale, 2017).



Avec traitement (300 100 50  $\mu$ l)



Sans traitement (300 100 50  $\mu$ l)

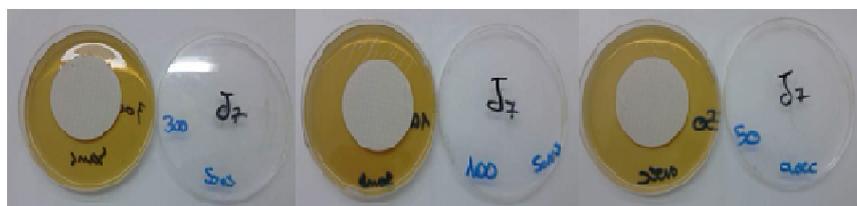


Témoin positif    Témoin négatif

**Figure 15.** Résultats de l'évaluation de l'activité antifongique sur une matrice alimentaire (J<sub>4</sub>) (Originale, 2017).



Avec traitement (300 100 50  $\mu$ l)



Sans traitement (300 100 50  $\mu$ l)



Témoin positif    Témoin négatif

**Figure 16.** Résultats de l'évaluation de l'activité antifongique sur une matrice alimentaire (J<sub>7</sub>) (Originale, 2017).

## **Chapitre 1**

# **Huiles essentielles**

## **Chapitre 2**

### **Matériel et méthode**

## **Chapitre 3**

### **Résultat et discussion**