

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB - BLIDA 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Laboratoire de recherche: biotechnologies, environnement et santé

THESE DE DOCTORAT

EN BIOLOGIE

Substances bioactives de thym (*Thymus guyonii* de Noé) et d'origan (*Origanum floribundum* Munby) : Caractérisation chimique et activités biologiques

Par

BOULAGHMEN Faïza

Devant le jury composé de :

G. TAIL	Professeur, U.S.D Blida-1	Présidente
K. HOUALI	Professeur, UMM Tizi-Ouzou	Examineur
N. SMAIL SAADOUN	Professeur, UMM Tizi-Ouzou	Examinatrice
M. HAZZIT	Professeur, ENSA El-Harrach	Examineur
F. SAIDI	Professeur, USD Blida-1	Directrice de thèse
C.CHAOUIA	MCA, USD Blida-1	Co-Directrice de thèse

Blida, Octobre 2019

RESUME

Thymus guyonii de Noé et *Origanum floribundum* Munby sont deux plantes aromatiques et médicinales endémiques et rares d'Algérie, appartenant à la famille des Lamiacées. Le thym pousse spontanément dans les montagnes de Sidi Bouzid Aflou (Laghouat-Algérie) qui fait partie du Sahara septentrional. L'origan quand à lui, pousse dans les hautes montagnes de Hammam Melouane (Blida-Algérie).

L'étude des deux espèces portent sur l'extraction des huiles essentielles (HE), caractérisation et analyse de leur activités antioxydantes, antimicrobiennes et cicatrisantes.

L'HE de *Thymus guyonii* a été identifiée à 98,2% de sa composition totale. Elle est constituée de 60 molécules dont les principales sont : le thymol à 35% (chénotype), suivi du α -terpinène à 18,7%, puis du p-cymène à 15,5%, du thymol methyl ether à 15,2%, de linalool à 4% et carvacrol à 2,2%. Alors que l'HE d'*Origanum floribundum* a été identifiée à 99,8% de ses composés. Elle se compose de 27 molécules dont le p-cymène à 53,4% qui représente son chénotype, suivi du thymol à 27,8%, du carvacrol à 8,4%, du carvacrol methyl ether à 3,9% et α -terpinène à 1,1%.

Les sites de sécrétion et de stockage des huiles essentielles sont localisés au niveau des organes de la partie aérienne des plantes (tiges, feuilles et fleurs).

L'activité antioxydante est étudiée in vitro par le pouvoir réducteur du fer ferrique et l'inhibition du radical DPPH. Cette étude a révélé que les HE de *Thymus guyonii* et d'*Origanum floribundum* possèdent des pouvoirs antioxydants appréciables comparés aux témoins butyl-hydroxy-toluène (BHT), tocophérol et acide ascorbique.

L'activité antimicrobienne a révélé que les HE des plantes disposent de spectres antimicrobiens considérables contre tous les microorganismes testés.

Les pommades dermiques préparées de *Thymus guyonii* et *Origanum floribundum* se sont avérées non irritantes et elles sont dotées d'un pouvoir cicatrisant à partir de 0,5% d'HE comparées à un médicament de référence *Centella asiatica* appelé Madécasol®.

Mots clés : *Thymus guyonii*, *Origanum floribundum*, huiles essentielles, activité antimicrobienne, antioxydante, pommade, cicatrisant.

Abstract

Thymus guyonii de Noé and *Origanum floribundum* Munby are two endemic rare medicinal Algerian plants belonging to the Lamiaceae family. The first commonly called Zāitra, grows spontaneously in the mountains of Sidi Bouzid Aflou (Laghouat-Algeria) which is part of the northern Sahara. The second called Zâatar grows in the high mountains of Hammam Melouane (Blida-Algeria).

The study of these plants concern the essential oils extraction, characterization and analysis of their antioxidant, antimicrobial and healing activities.

Thyme essential oil has been identified at 98.2% of its total composition. It consists of 60 molecules, the main ones being: Thymol 35% (chemotype), followed by α -Terpinene 18.7%, then p-Cymene 15.5%, Thymol methyl ether 15.2% %, Linalool at 4% and Carvacrol at 2.2%. While the Oregano essential oil has been identified to 99.8% of its compounds. It consists of 27 molecules including p-Cymene is at 53.4% which represents its chemotype, followed by Thymol at 27.8%, Carvacrol at 8.4%, Carvacrol methyl ether at 3.9% and α -Terpinene. at 1.1%.

The sites of essential oils secretion and storage are located in the organs of the plants aerial part (stems, leaves and flowers).

The antioxidant activity is studied in vitro by the reducing power of ferric iron and the inhibition of the radical DPPH. This study revealed that Thyme and Oregano essential oils have good antioxidant properties compared to the controls Butyl Hydroxy Toluene (BHT), Tocopherol and Ascorbic Acid.

The antimicrobial activity revealed that the plants essential oils have considerable antimicrobial spectra against all microorganisms tested.

Dermal ointments prepared with essential oils of Thyme and Oregano have proven non-irritating and they have a good healing power at concentrations of 0.5% and 1% by comparing with a reference medicine Centella asiatica 1% called Madecasol®.

Key words: *Thymus guyonii*, *Origanum floribundum*, essential oils, antimicrobial activity, Antioxidant, Ointment, Healing.

ملخص

Thymus guyonii de Noé و *Origanum floribudum* Munby

هما نباتيين طبيبتين نادرتين و مستوطنتين بالجزائر، تنتمي إلى عائلة لامياسي : الأولى تسمى على العموم زعيترة، تنمو تلقائيا في جبال سيدي بوزيد بي افلو ولاية الاغواط (الجزائر)، الواقعة في شمال الصحراء. الثانية تدعى زعتر التي تنمو في جبال حمام ملوان بشرية ولاية البليلة (الجزائر)، لدراسة هاتين النباتين تكون باستخلاص الزيوت الأساسية العطرية لتشخيصها و تحليل مفعولها ضد الأكسدة و مضادة للميكروبات و مندبة للجروح.

الزيوت الاساسية العطرية لنبته الزعيترة شخصت بنسبة 98 بالمائة من التركيب الكلي فهي مكونة من 60 جزئية أساسها التيمول بنسبة 35 بالمائة (كيوتيب)، γ تريبيان بنسبة 18 بالمائة، ثم بسينان (15،5 بالمائة)، ثم تيمول متيل ايثر (15،2 بالمائة)، لينالول (4 بالمائة) و الكارفاكول (2،2 بالمائة).

أما الزيوت الاساسية العطرية لنبته ، تم تشخيصها بنسبة 99،8 بالمائة من تركيبها. حيث تتركب من 27 جزئية من ضمنها بسيمان كمركب أساسي بنسبة 53،4 بالمائة، يليه تيمول بنسبة 27،8 بالمائة، ثم الكارفاكول بنسبة 8،4 بالمائة، ثم كارفاكول متيل ايثر بنسبة 3،9 بالمائة و γ تريبيان 1،1 بالمائة.

ان المراكز المفرزة و المخزنة للزيوت العطرية تتركز في الأعضاء الخارجية للنبته (الساق، الأوراق و الأزهار).

دراسة عملية ضد الأكسدة مخبريا بطريقتين : مفعول قوة ارجاع الحديد و الثانية عملية تثبيط جزر DPPH. هذه الدراسة نتج منها أن الزيوت الاساسية العطرية لها مفعول قوي ضد الأكسدة مقارنة بمواد شاهدة (BHT, Tocophérol, acide ascorbique).

بينت الدراسة ضد الميكروبات أن هذه الزيوت الاساسية العطرية تحتوي على فعالية كبيرة ضد جميع الجراثيم المدروسة.

تم تحضير مراهم جلدية تحوي على الزيوت الاساسية العطرية لنبته الزعتر و الزعيترة بنسبة 0،5 و 1 بالمائة، حيث أن هذه المراهم لها فعالية في معالجة و التأم الجروح مقارنة بمراهم مرجعي (1% madécassol). بالإضافة فإن تلك المراهم لم تتسبب في ظهور أعراض جانبية جلدية لدى الحيوانات المخبرية.

الكلمات المفتاحية : *Thymus guyonii* [*Origanum floribundum*] الزيوت الاساسية العطرية، الدراسة ضد الميكروبات، عملية ضد الأكسدة، مراهم جلدية، التأم الجروح.

DÉDICACES

Je dédie ce travail de recherche à mes très chers parents, qui m'ont toujours soutenu et encouragé durant toutes mes études; à ma mère que j'aime plus que tout et qu'elle est toujours présente et attentive, je lui souhaite longue vie; à mon défunt père Allah yerahmou. Qu'ils trouvent ici une infime représentation de ma gratitude et ma reconnaissance.

À ma sœur amie adorée Farida, chez qui j'ai toujours trouvé la force d'aller vers l'avant.

À mes frères merveilleux Adlane et Sid-Ahmed pour leur disponibilité.

À mon cher mari attentif Abdou dont il est le pilier de cette réussite, à qui je dois beaucoup.

À mes enfants adorés que j'aime énormément Chahinez, Houssein et Manel, qui par leurs présence m'encouragent à tout instant.

À mon neveu que j'aime comme mon deuxième fils Abdelaziz.

À mes belles sœurs Samia, Faiza, Nabila, Besma, à mes beaux-frères Abd-racuf;

abdel-ghani, leurs conjointes Zoulikha; Habiba; Mohamed et leurs enfants

Roufida, Nihal, Imène, Chiraz, Boualem-Wassim, Mohamed-Riad, Rafik-

Mounir, Medina, Madjid, Feriel, Ithem et Mohamed rafrechane.

À toute ma grande famille respectueuse, Boulaghmen, Kalache et Boudis.

À tous ceux et celles qui œuvrent de près ou de loin pour que brille la lumière du savoir.

FALZA

REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Madame le Professeur SAIDI F., ma directrice de thèse, pour m'avoir accordé sa confiance en acceptant de diriger ce travail, ses conseils judicieux et son aide en toutes circonstances, ainsi que Dr Chaouia pour avoir co-dirigé ce travail, pour m'avoir fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail, qu'elles trouvent ici l'expression de ma grande considération.

Mes remerciements s'adressent au Professeur TAIL G., Professeur à l'université de Blida-1, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

J'exprime ma profonde reconnaissance au Pr HAZZIT M., de l'ENSA El Harrach, ainsi que Pr SMAIL SAADOUN N., et Pr HOUALI K., de l'université Mouloud Maamari de Tizi-Ouzou, qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je remercie Mr NOUAS président-directeur général de SAIDAL, pour m'avoir accueilli, pour la confiance et l'aide qu'il m'a accordé.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Mme Nacer-bey N., responsable du laboratoire des huiles essentielles, Mme Recham, Mme Boukhari et Melle Akkache du laboratoire de microbiologie, Melle Djillani et Arselane du laboratoire de galénique, Mme Azine et Mme Bouchène du laboratoire pharmaco-toxicologie, Mme kafi, Mlle Wissem et Mme Chekoufi du laboratoire de chimie analytique du CRD SAIDAL El-Harrach et Melle Bouhouna du laboratoire Biotic-usine de SAIDAL El-Harrach.

Mes plus vifs remerciements et ma reconnaissance sont exprimés au Dr Aklil G., chef de service du laboratoire d'Anatomie pathologique, Dr Benchoubane L., chef de service du laboratoire central ainsi que Mr Aouni D, Mr Zaibak T., responsables du laboratoire

d'urgence de l'EPH de Koléa. Ainsi que Dr Abdellatif L., Dr Lalaoui F., Dr Gougam., Mme Meslioui M., et Melle Kheireddine D.

Particulièrement, je remercie mes collègues, Mr Merasli, Mme Lamroussi, Mme Benderadji, Dr Boudour, Melle Haddouche, Melle Balahouane, Mme Rakeche, Melle Goudjila, Mme Habibeche, Mme Aimeur, Mme Belaid, Dr Kersani, Dr Bouzidi, Dr Chaib et Dr Melikaoui, qu'ils trouvent ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

Je tiens à exprimer mes reconnaissances à tous ceux qui m'ont encouragé et aidé de près ou de loin à la concrétisation et la réalisation de ce travail.

Je remercie également mes camarades de promotion de magister biotechnologies végétales surtout Melle Feknous S., Mme Miliani A., Melle Fenagra L., Mme Benouaklil F., Mme Chaabane D., Mr Boukhatem N., Mme Dakiche S., Mme Bentoura S., Melle Ouahchia C., Mme Hemma R, Mme Mouheb S., Mme Loukhaoukha R., mes enseignants et tout le personnel des laboratoires du département de biologie, pour la contribution qu'ils ont apportés à mon travail.

FAIZA



TABLE DES MATIERES

RESUME	1
ABSTRACT	2
ملخص	3
DEDICACES	4
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	12
Introduction	19
CHAPITRE 1: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	21
I Présentation des espèces étudiées	21
1. Monographie de l'Origan: <i>Origanum floribundum</i> Munby	21
1.1 Historique	21
1.2 Systématique de la plante	21
1.3 Description botanique de l'espèce <i>Origanum floribundum</i> Munby	22
1.4 Répartition et habitat	23
1.5 Récolte et parties utilisées	24
1.6 Domaine d'utilisation et vertus thérapeutiques	24
1.7 Composition chimique des huiles essentielles	25
2. Monographie du thym: <i>Thymus guyonii</i> de Noé	25
2.1 Historique	25
2.2 Etude systématique	26

2.3 Description botanique de l'espèce <i>Thymus guyonii</i> de Noé	26
2.4 Origine, habitat et répartition	27
2.5 Culture, récolte et parties utilisées	30
2.6 Utilisation culinaire et thérapeutique	30
2.7 Composition chimique des huiles essentielles	32
3. Méthodes d'extraction et conservation des huiles essentielles	32
4. Analyse des huiles essentielles	33
5. Activités pharmacologiques des huiles essentielles	34
5.1 Activité antioxydante	34
5.2 Activité antimicrobienne	34
5.3 Activité cicatrisante	34
6. Localisation cellulaire des huiles essentielles de l'Origan et du thym	35
CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES	36
2.1 Matériel biologique utilisé	36
2.1.1 Description d' <i>Origanum floribundum</i> Munby et <i>Thymus guyonii</i>	36
2.1.2 Site de prélèvement des plantes étudiées	36
2.2 Méthode d'étude	39
2.2.1 Aspect macro et microscopique	39
2.2.2. Extraction des huiles essentielles	40
2.2.3. Caractérisation des huiles essentielles	42
2.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante	46
2.2.5. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	49
2.2.6. Préparation d'une pommade à usage topique	56

2.2.7. Essais pharmaco-toxicologiques	63
2.2.8. Analyse statistique	68
CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION	69
3.1 Etude botanique d' <i>Origanum floribundum</i> Munby	69
3.1.1 Etude macroscopique de la fleur	69
3.1.2 Etude macroscopique de la feuille d'origan	72
3.1.3 Etude macroscopique de la tige	73
3.1.4 Etude microscopique de la tige	74
3.1.5 Etude microscopique de la feuille d'origan	77
3.2. Etude botanique du thym	82
3.2.1. Etude macroscopique de la fleur	82
3.2.2. Etude macroscopique de la feuille du thym	83
3.2.3. Etude macroscopique de la tige	84
3.2.4. Etude microscopique de la tige	85
3.2.5. Etude microscopique de la feuille de thym (coupes à main levée et au microtome)	87
3.3. Extraction et rendement en huile essentielle d'origan et de thym	89
3.3.1. Détermination du taux d'humidité de la matière végétale	89
3.3.2. Etude de la cinétique d'extraction	90
3.4. Caractérisation des huiles essentielles de l'origan et du thym	92
3.4.1. Caractéristiques organoleptiques	92
3.4.2. Indices physico-chimiques	92
3.4.3. Analyses qualitative et semi-quantitative des HE par CPG/SM	94

3.5. Evaluation de l'activité antioxydante d'HE de l'origan et du thym	102
3.5.1. Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	102
3.5.2. Pouvoir réducteur	105
3.6. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne des HE des espèces étudiées	106
3.6.1. Bactéries Gram ⁺	108
3.6.2. Bactéries Gram ⁻	108
3.6.3. Levures	109
3.6.4. Analyse statistique	109
3.7. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne	115
3.8. Préparations et contrôle physico-chimique des pommades dermiques	120
3.8.1. Détermination des caractères organoleptiques	120
3.8.2. Contrôle de l'homogénéité	121
3.8.3. Evaluation de la stabilité et vieillissement accéléré	121
3.8.4. pH des pommades dermiques	121
3.8.5. Contrôle de la qualité microbienne des pommades dermiques obtenues	121
3.9. Essais pharmaco-toxicologiques	122
3.9.1. Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée (IPC) de l'HE	123
3.9.2. Analyse de la cicatrisation de plaies in vivo des pommades dermiques	125
CONCLUSION GENERALE	134
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	138

APPENDICES

- A. Liste des abréviations, symboles et conventions
- B. Composition des milieux de culture utilisés.
- C. Photos de quelques appareils utilisés et test biologique
- D. Protocoles utilisés.
- E. Entretien des animaux de laboratoire.
- F. Tableaux illustrés de quelques résultats.
- G. Résultats des activités biologiques testés.
- H. Etude statistique
- I. Glossaire.

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1: <i>Origanum floribundum</i> Munby	21
Figure 1.2: Sommitées fleuries (a et b) et corolle (c) d'origan	22
Figure 1.3 : Aire de distribution du genre <i>Origanum</i> dans le monde	23
Figure 1.4: <i>Thymus guyonii</i> de Noé fleuri	26
Figure 1.5: <i>Thymus guyonii</i> de Noé	27
Figure 1.6: Répartition géographique du thym dans le monde	28
Figure 1.7 : Coupe transversale des feuilles d' <i>Origanum heracleoticum</i> , <i>Origanum vulgare</i> et <i>Thymus vulgaris</i>	35
Figure 2.1: Tiges décombantes et prostrées d' <i>Origanum floribundum</i>	36
Figure 2.2: Inflorescences d' <i>Origanum floribundum</i>	36
Figure 2.3: Vue générale des montagnes de Hammam Melouane	37
Figure 2.4: Vue général d'une étendue de thym à Sidi Bouzid	37
Figure 2.5: Tiges prostrées et rampantes de <i>Thymus guyonii</i>	38
Figure 2.6: Inflorescence de <i>Thymus guyonii</i>	38
Figure 2.7 : Réaction du radical DPPH avec un antioxydant AH	46
Figure 2.8 : Procédé de la mise en œuvre du test du pouvoir réducteur	49
Figure 2.9 : Schéma simplifié du principe de la méthode des chromatogrammes	50
Figure 2.10 : Protocole d'analyse de la qualité microbienne des préparations pharmaceutiques (pommades dermiques) (Monographies de la pharmacopée	62
Figure 2.11 : Flanc de lapin rasé	64
Figure 2.12 : a et b: rasage du rat (Original, 2014)	66

Figure 2.13 : cicatrice symétrique et circulaire (5mm)	66
Figure 3.1 : Inflorescences en épis, réunis en corymbe d'origan	70
Figure 3.2 : Présence des trichomes et poils tecteurs au niveau du périanthe	70
Figure 3.3 : disposition des étamines et carpelle dans la corolle	71
Figure 3.4 : Etamine muni d'un filet à la loupe	71
Figure 3.5 : Présence de trichomes au niveau du carpelle observés à la loupe	72
Figure 3.6 : Akène tapissé de poils tecteurs et trichomes glandulaires	72
Figure 3.7 : Présence des trichomes et poils tecteurs sur la face supérieure de la feuille observés à la loupe	72
Figure 3.8 : Présence des trichomes et poils sécréteurs sur la face inférieure de la feuille observés à la loupe	73
Figure 3.9 : Présence de poils tecteurs et peu de trichomes sur la tige	73
Figure 3.10 : Coupe transversale de la tige <i>d'Origanum floribundum</i>	75
Figure 3.11 : Coupe transversale d'une partie de la tige <i>d'Origanum floribundum</i> montrant deux trichomes glandulaires à main levée après double coloration	75
Figure 3.12 : Coupe transversale d'une vue générale de la tige <i>d'Origanum floribundum</i> au microtome	76
Figure 3.13 : Coupe transversale d'une portion de la tige au microtome	76
Figure 3.14 : Coupe transversale de la nervure principale <i>d'Origanum floribundum</i> à main levée	77
Figure 3.15 : Coupe transversale d'une partie de la feuille <i>d'Origanum floribundum</i> à main levée montrant différents types de trichomes glandulaires	79
Figure 3.16 : Coupe transversale d'une partie de la feuille <i>d'Origanum floribundum</i> Gr x 40 x 10, montrant différents de poils tecteurs	79

Figure 3.17 : Coupe transversale d'une feuille d' <i>Origanum floribundum</i> (Gr x 40 x 10)	80
Figure 3.18 : Coupe transversale au niveau de la nervure principale (Gr x 40 x 10)	80
Figure 3.19 : Coupe transversale d'une partie de la feuille d'origan montrant un trichome glandulaire en forme de rosette, (Gr x 40 x 10)	81
Figure 3.20: Inflorescence du thym	82
Figure 3.21: Calice à tube ventru à la loupe	82
Figure 3.22: Sommités fleuries à la loupe du thym	83
Figure 3.23: Arrangement des étamines et carpelle dans la corolle	83
Figure 3.24: Présence de trichomes sur l'étamine	83
Figure 3.25: Carpelle comportant des trichomes glandulaires à la loupe	83
Figure 3.26: Feuilles du thym	84
Figure 3.27: Feuilles ovales, oblongues, opposées, ciliées à la base	84
Figure 3.28: Face supérieure de la feuille est glabre	84
Figure 3.29: Face inférieure de la feuille	84
Figure 3.30: Plante de <i>Thymus guyonii</i>	84
Figure 3.31: Tige rampante et très diffuse	84
Figure 3.32: Coupe transversale de la tige (Gr x 4 x 10)	85
Figure 3.33: Poils tecteurs et trichome de la tige au microscope	85
Figure 3.34: Coupe transversale de la tige (G x 10 x 10)	86
Figure 3.35: Coupe transversale de la tige au microtome (G x 10 x 10)	86
Figure 3.36 : Coupe transversale d'une partie de la feuille (Gr x 40 x 10)	87

Figure 3.37 : Coupe transversale de la feuille au microtome (Gr x 4 x 10) (a) et (Gr x 10 x 10) (b)	88
Figure 3.38: Coupe transversale d'une partie de la feuille au microtome (Gr x 4 x10) (au microscope)	88
Figure 3.39 : Cinétique d'extraction de l'HE d' <i>Origanum floribundum</i> et de <i>Thymus guyonii</i>	91
Figure 3.40: Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle d' <i>Origanum floribundum</i> de Hammam Melouane-Blida	94
Figure 3.41: Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle de <i>Thymus guyonii</i> d'Aflou-Laghouat	95
Figure 3.42 : Différents constituants d' <i>Origanum floribundum</i>	98
Figure 3.43 : Principaux constituants majoritaires d' <i>Origanum floribundum</i>	98
Figure 3.44 : Secteurs de différentes classes chimiques d' <i>Origanum floribundum</i>	98
Figure 3.45 : Différents constituants de <i>Thymus guyonii</i>	99
Figure 3.46 : Principaux constituants majoritaires de <i>Thymus guyonii</i>	99
Figure 3.47 : Secteurs de différentes classes chimiques de <i>Thymus guyonii</i>	99
Figure 3.48 : Représentation graphique du pouvoir d'inhibition du radical DPPH par les échantillons d'HE et les standards (BHT et tocophérol)	103
Figure 3.49 : Test du pouvoir réducteur de l'HE des espèces étudiées en comparaison aux antioxydants de références: tocophérol, BHT et acide ascorbique	105
Figure 3.50: Zones d'inhibition de l'HE d' <i>Origanum floribundum</i> et <i>Thymus guyonii</i> testées sur des bactéries Gram positifs (A, B, C, D et E)	110
Figure 3.51: Zones d'inhibitions de l'HE d' <i>Origanum floribundum</i> et <i>Thymus guyonii</i> testées sur des bactéries Gram négatifs (A', B', C'et D')	111
Figure 3.52 : Zones d'inhibitions de l'HE d' <i>Origanum floribundum</i>	112

<i>et Thymus guyonii</i> testées sur levures	
Figure 3.53 : Dénombrement des colonies obtenues de la souche <i>Candida albicans</i> après 48 h d'incubation et d' <i>Escherichia coli</i> après 24h d'incubation	119
Figure 3.54 : Pommade dermique à base d'HE d'origan	120
Figure 3.55 : Observation de la pommade dermique au microscope photonique (test d'homogénéité) (Gr x 10 x 10)	121
Figure 3.56 : Flancs de lapins témoins après scarification et sans traitement	123
Figure 3.57 : Flancs de lapins testés, après scarification et application de la pommade à base d'HE d' <i>Origanum floribundum</i>	123
Figure 3.58 : Flancs de lapins testés, après scarification et application de la pommade à base d'HE de <i>Thymus guyonii</i>	123
Figure 3.59: Evolution du processus de cicatrisation des plaies profondes circulaires	128
Figure 3.60 : Evolution de la surface de la lésion chez le rat, en fonction du temps	129
Figure 3.61 : Taux des contractions des blessures chez le rat en fonction du temps	130
Figure 3.62 : Evaluation de la profondeur de la lésion chez le rat en fonction du temps	132
Tableau 1.1: Répartition géographique des deux espèces d'Origan en Algérie	24
Tableau 1.2 : Principales localisations géographiques du thym en Algérie	29
Tableau 1.3: Composition nutritionnelle et valeurs ORAC du thym sec	31
Tableau 2.1:Caractéristiques des régions (sites de prélèvements)	37
Tableau 2.2 : Caractéristiques des souches microbiennes et fongiques testées	51

Tableau 2.3 : Excipients de la pommade à base d'HE d' <i>Origanum floribundum</i> et de <i>Thymus guyonii</i>	57
Tableau 2.4 : Composition de la pommade dermique	57
Tableau 2.5 : Estimation de la tolérance cutanée in vivo	65
Tableau 2.6 : Suivi du processus de cicatrisation	67
Tableau 3.1: Rendement en HE des deux plantes étudiées	89
Tableau 3.2 : Taux d'humidité de la matière végétale	90
Tableau 3.3 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE des espèces étudiées	92
Tableau 3.4 :Caractéristiques physico-chimiques de l'HE des espèces étudiées	93
Tableau 3.5 :Composition chimique de l'HE(%) des deux espèces étudiées	96
Tableau 3.6 : Comparaison entre les teneurs (%) des composés majoritaires des HE d' <i>Origanum floribundum</i> d'Algérie selon les régions	100
Tableau 3.7: Comparaison entre les teneurs(%) des composés d'HE de <i>Thymus guyonii</i> étudiées d'Algérie	101
Tableau 3.8: Activité antimicrobienne de l'huile essentielle d' <i>Origanum floribundum</i> et de <i>Thymus guyonii</i> sur milieu solide	107
Tableau 3.9: Valeurs CMI et CMB / CMF d'HE des espèces étudiées vis à vis des souches microbiennes testées	116
Tableau 3.10 : Rapport CMB/CMI, CMF/CMI de d'HE des espèces testées vis-à- vis des souches bactériennes et des levures	118
Tableau 3.11 : Contrôle microbiologique des pommades dermiques	122
Tableau 3.12 : Estimation de l'indice d'irritation cutanée primaire chez des lapins traités par la pommade d'HE des deux espèces	124
Tableau 3.13 : Appréciation des réactions cutanées	124

Tableau 3.14 : Estimation des paramètres de cicatrisation chez le rat 126
en fonction du temps (jours)

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

L'Algérie, par son climat varié comporte une flore assez riche et diversifiée, au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique. Elle renferme de nombreuses plantes à caractère thérapeutique. Les fleurs et les plantes aromatiques étaient utilisées pour leurs propriétés antiseptiques, antivirales et antibactériennes. Car elles comportent des huiles essentielles [1,2].

L'usage des HE est l'une des alternatives de substitution dans la plupart des cas d'infection dans le cas de problèmes d'abus d'antibiotiques.

Les HE chémotypées, avec leur composition, leur nature et avec une posologie dosée et étudiée cliniquement, n'induisent ni résistance des germes, ni atteinte du système immunitaire, ni sélectivité des flores saprophytes et pathogènes [3,4].

Certaines HE ont montré qu'elles pourraient combattre le facteur de vieillissement par l'inhibition des radicaux libres présents sur la peau [5].

Ces derniers initient des réactions en cascade comme la peroxydation lipidique, ce qui altèrent les lipides et protéines cellulaires provoquant le vieillissement cellulaire, altération de l'ADN, maladies du cœur, cancer ainsi que d'autres maladies dégénératives [6]. De récentes recherches se sont orientées vers l'étude de l'activité antioxydante des HE naturelles qui remplacent les additifs synthétiques s'avérant être cancérigène et toxique.

Parmi les plantes aromatiques et médicinales d'Algérie, nous nous sommes intéressés à deux espèces appartenant à la même famille des Lamiaceae: *Origanum floribundum* Munby (origan) et *Thymus guonii* de Noé (thym). Ainsi, les huiles essentielles de ces plantes aromatiques comptent parmi les plus étudiées [7].

L'objectif de ce travail est d'une part de déterminer et de quantifier les différents composants des HE d'*Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii* poussant en Algérie, et d'autre part valoriser leurs HE, par des essais de certaines propriétés biologiques.

Notre recherche a porté sur:

- Description botanique des parties aériennes des deux espèces étudiées: *Thymus guyonii* de Noé et d'*Origanum floribundum* Munby.
- Extraction des huiles essentielles des plantes testées.
- Détermination du rendement, cinétique d'extraction ainsi que les indices physico-chimiques des huiles essentielles.

Dans la seconde partie nous avons testé les activités biologiques des huiles essentielles notamment:

- Activité antioxydante en utilisant le test notamment au DPPH: radical 2-2 Diphényl-1-picryl Hydrazyl et le pouvoir réducteur.
- Activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur milieu solide en établissant les concentrations minimales inhibitrices (CMI), bactéricides (CMB) pour les bactéries et fongicides (CMF) pour les levures.
- Activité cicatrisante par la formulation d'une pommade dermique à usage topique à raison de 0,5% et 1%, comparée à un médicament de référence *Centella asiatica* 1% (Madécasol®). Ce test est effectué sur des rats albinos Wistar de 200g, après des contrôles physico-chimiques, antimicrobiens et essais pharmaco-toxicologiques sur lapins albinos Néozélandais de 2,5 à 3kg. Ces expérimentations ont été réalisées au niveau du laboratoire pharmacie galénique du CRD de SAIDAL.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: Présentation des espèces étudiées

1. Monographie de l'origan: *Origanum floribundum* Munby

1.1 Historique

L'origan est utilisé par les Grecs depuis l'Antiquité. Ils en faisaient un grand usage. Le nom de l'origan dérive des mots grecs «*oros ganos*» qui veulent dire pour certains «ornement des montagnes» et pour d'autres « joie des montagnes ». L'origan était autrefois également appelé herbe porte-bonheur. Il est encore largement conseillé de nos jours par les phytothérapeutes [8,9].

1.2 Systématique de la plante

L'origan appartient à la famille des Lamiaceae. C'est l'une des familles botaniques les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien et antioxydant [10]. Elle regroupe entre 200 et 250 genres et entre 3200 et 6500 espèces [11]. Le genre *Origanum* renferme des arbustes nains, des plantes annuelles, bisannuelles. La classification de l'origan est comme suit [12,13,14] et Tela Botanica [15]:

Classe: *Magnoliopsida*

Sous classe: *Asteridae*

Ordre: *Lamiales*

Famille: *Lamiaceae*

Sous famille: *Nepeitodeae*

Genre: *Origanum*

Espèce: *Origanum floribundum* Munby

Noms vernaculaires: [16,17]

- Français: origan ou origan commun
- Anglais: oregano
- Arabe: زعتر Zâatar ou صعتر Sâatar

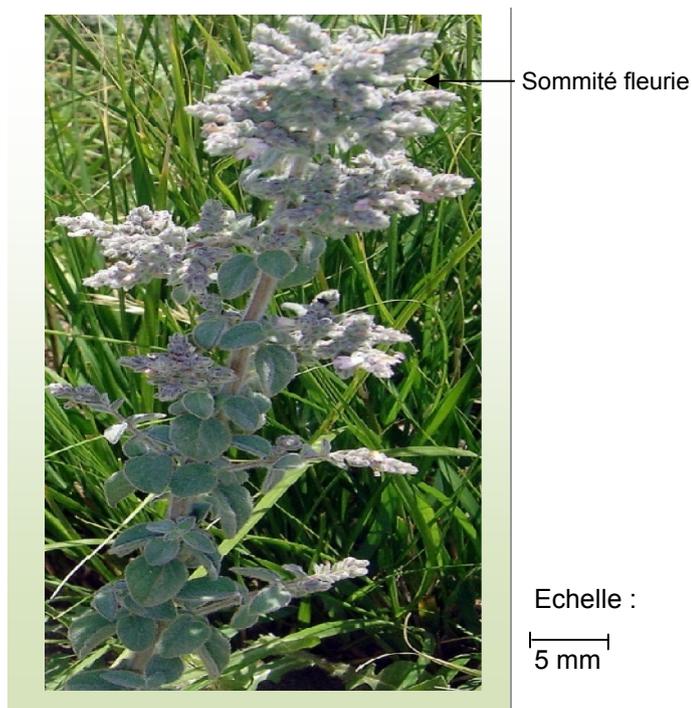


Figure 1.1: *Origanum floribundum* Munby

(originale, 2014).

1.3 Description botanique de l'espèce *Origanum floribundum* Munby

La variation morphologique dans le genre a mené à la distinction de **10 sections** consistant en **42 espèces** ou **49 taxons** (espèces, sous espèces et variétés) [18]. L'origan est une plante vivace ligneuse, elle est pourvue d'un rhizome ligneux, la tige est prostrée à la base. Elle peut atteindre 60 cm de long, de couleur rougeâtre, elle est tapissée de poils dont la coloration est brune ou gris foncé de 1,5mm de long (figure 1.1). Les jeunes tiges sont décombantes, quadrangulaires à courts rameaux à l'aisselle des feuilles. Les feuilles excèdent un nombre de 25 paires par tige, avec de courts pétioles de 12 mm de long. Leur forme est en cœur ou ovale avec une longueur de 3-23 mm et 2-25 mm de largeur. Elles sont épaisses, de couleur vert grisâtre. Les Glandes sessiles discrètes leur nombre est plus que 1700 /cm². Les fleurs sont sub-sessiles avec des calices de 2,4 à 4 mm de long. Ces derniers sont velus et dentelés, ils présentent une longueur de 0,5 à 1,5 mm. La corolle mesure 4 à 7,5 mm de couleur rose, elle est couverte de poils épidermiques sur la partie externe [19,20].

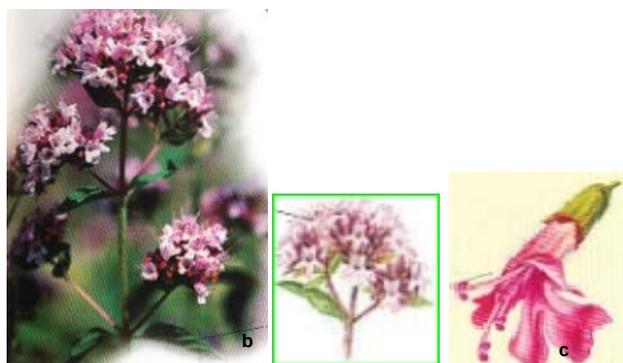


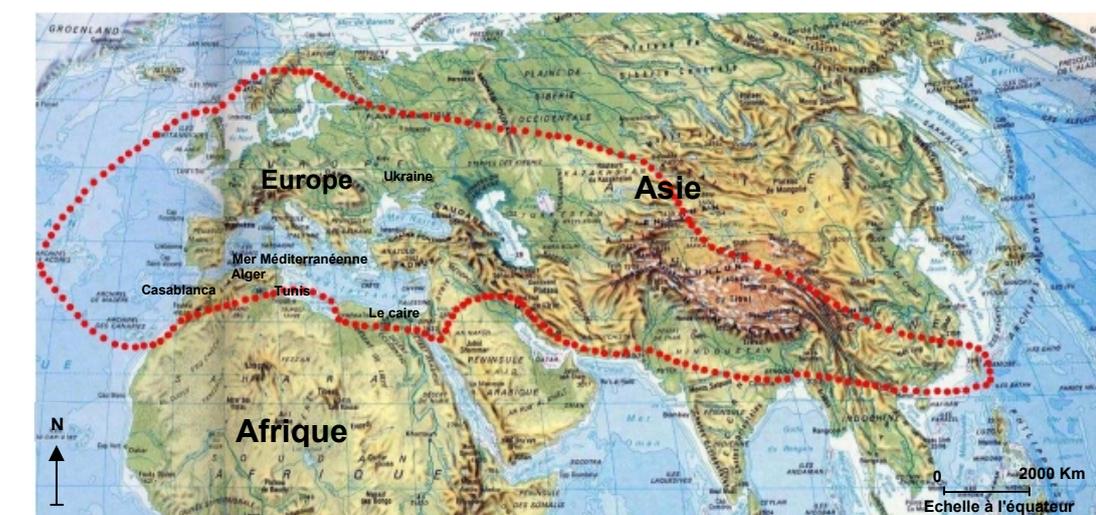
Figure 1.2: Sommitées fleuries (a et b) et corolle (c) d'origan [21].

La corolle est constituée d'une lèvre supérieure divisée en deux lobes dont la longueur est de 0,4 mm chacun et d'une lèvre inférieure trilobée quelque peu inégale de 0,5 à 1,5 mm de long (figure 1.2). Les étamines sont au nombre de 4, filamenteuses, de 2,5 à 4mm de long. Elles sont exsertes, droites, écartées et divergentes [22, 23, 24]. L'ovaire est supère, bicarpellaire, elle est divisée en 2 loges comportant 2 ovules chacune [25]. Le stigmate montre une longueur de 9mm. La floraison se réalise entre juin et août, chaque fleur donne à maturité 4

graines. Les sommités fleuries sont parsemées de petites glandes contenant les huiles essentielles qui donnent à la plante son arôme et saveur [26]. Le fruit est constitué de 4 akènes libres et lisses de couleur marron foncée, contenus dans le calice devenu coriace [27].

1.4 Répartition et habitat

L'origan pousse surtout dans les pays du pourtour méditerranéen, en Europe et en Asie (Figure 1.2). Sa présence est surtout dans les montagnes jusqu'à 1500 à 2000m d'altitude [28, 29]. L'origan préfère les terrains fertiles et meubles à tendance calcaire. Il supporte bien le froid et la sécheresse [30]. Parmi les 49 taxons d'*origanum*, 13 espèces sont classées comme rares dont *Origanum floribundum* [22].



●●● Limite de distribution

Figure 1.3 : Aire de distribution du genre *Origanum* dans le monde [22, 31, 32].

L'origan est représenté par deux espèces en Algérie en l'occurrence, *Origanum glandulosum* et *Origanum floribundum*. Cette dernière est une espèce endémique d'Algérie (Tableau 1.1).

Tableau 1.1: Répartition géographique des deux espèces d'origan en Algérie [19 et 33].

Espèces	Localisation et caractéristiques
<i>origanum glandulosum</i> Desfontaines	<ul style="list-style-type: none"> - Commune dans tout le Tell. - Endémique Algéro-Tunisienne. - Pousse dans les garrigues et les broussailles.
<i>origanum floribundum</i> Munby	<ul style="list-style-type: none"> - Espèce rare. Pousse dans la partie nord centrale (Kabylie, Médéa, Blida). - Endémique d'Algérie. - Pousse en montagne et sert de pâturage.

1.5 Récolte et parties utilisées

L'origan est récolté en tant que substance brute et comme source d'huile essentielle et d'extraits. Les fleurs et feuilles d'origan sont utilisées à des fins médicinales et les parties aériennes à la distillation et sont récoltées en début de floraison. Deux récoltes sont faites pendant l'année, en début d'été et en début d'automne. Les deux récoltes sont faites alors au début de la floraison (on récolte des boutons floraux) ou quand les fleurs s'épanouissent (pleine floraison) [32].

1.6 Domaine d'utilisation et vertus thérapeutiques

L'origan est une herbe aromatique, c'est un ingrédient essentiel dans la cuisine méditerranéenne [9]. L'origan contient de nombreuses vitamines telles que: la vitamine E, B₆, riboflavine (vitamine B₂), niacine (B₃), acide folique (B₉), acide pantothénique (B₅) et biotine (B₈). Des travaux ont montré que dans 100g de feuilles fraîches, nous avons 45mg de vitamine C , 0,07mg de thiamine et 0,81mg de carotène. L'origan possède aussi des minéraux comme le fer, cuivre, soufre, chlore, iode et sélénium. La quantité de 100g de fleurs fraîches contient 310mg de calcium, 53mg de magnésium, 39mg de phosphore, 0,9mg de zinc et 0,3mg de manganèse. Des recherches ont montré que la fraction non polaire des extraits d'origan contient α -, β -, γ - et δ -tocophérol et seraient impliqués dans l'activité antioxydante de l'origan [34].

Les sommités fleuries de l'origan peut être utilisé en usage thérapeutique interne ou externe:

➤ En usage interne:

Action sédative, traitement de bronchite chronique et aiguës bénignes, expectorante, apéritive, antispasmodique, stomachique, carminative, antiseptique, diurétique. Elle est aussi recommandée en cas de manque d'appétit, d'aérophagie, de toux, d'irritation, d'asthme, d'absence de règles, maux de tête et de dents.

➤ En usage externe:

Action antalgique et parasiticide; utile contre la pédiculose, les rhumatismes et la cellulite [13, 35, 36].

1.7 Composition chimique des huiles essentielles

Les composés majoritaires les plus fréquents chez l'origan sont:

- ✓ Le carvacrol est le composant majoritaire de l'HE d'origan. Cependant, il peut être le thymol, qui est l'isomère du carvacrol, dans d'autres cas il s'agit d'autres molécules majoritaires.
- ✓ Le thymol est présent dans la plupart des espèces d'origan comme *Origanum floribundum* [37] et *Origanum vulgare* [38].
- ✓ Les sesquiterpènes sont retrouvées au niveau d'*Origanum vulgare* L [39].
- ✓ β - caryophyllène, germacrene D et sabinène sont présents au niveau d'*Origanum.vulgare* [40,41].

2. Monographie du thym: *Thymus guyonii* de Noé

2.1 Historique

Le thym est l'aromate de base le plus universellement utilisé dans la cuisine méditerranéenne depuis des siècles. C'est une plante aromatique la plus employée en thérapie, c'est un antiseptique puissant utilisé depuis les temps les plus anciens. Les Egyptiens l'utilisaient déjà pour l'embaumement de leurs défunts, les Grecs pour parfumer l'eau des bains et temples, les Romains pour purifier leurs appartements [8]. Les valeureux guerriers de la Rome antique prenaient des bains au thym pour se fortifier et ne pas perdre courage pendant la

bataille. Le terme *thymus* vient du mot grec «*thymon*», qui signifie «courage» et «force» [42].

2.2 Etude systématique

Le genre *Thymus* est l'un des genres les plus importants des Lamiacées. Il est considéré comme un genre bien défini, basé sur les caractéristiques morphologiques et chimiques de ses espèces [43]. L'extrême variabilité et les hybridations interspécifiques, ont rendu la détermination des espèces très délicate (Quézal et Santa, 1963) [19].

La classification botanique du thym [12,13,14,44] est représentée comme suit:

Classe: *Magnoliopsida*

Sous classe: *Asteridae*

Ordre: *Lamiales*

Famille: *Lamiaceae*

Sous famille: *Nepeitodeae*

Genre: *Thymus*

Espèce: *Thymus guyonii* de Noé

Noms vernaculaires: [13, 17]

- Français: Thym commun, thym des jardins, farigoule.
- Anglais: Common thyme, garden thyme.
- Arabe: زعيرة Zaiitra.



Figure 1.4: *Thymus guyonii* de Noé fleuri (originale, 2014).

2.3 Description botanique de l'espèce *Thymus guyonii* de Noé

C'est une plante vivace buissonnante, glabre, pousse en sols caillouteux, pierreux et plutôt secs. Elle peut atteindre 30cm de hauteur, prostrée, rampante, et odorante. Elle possède des tiges ligneuses, rameuses et tortueuses à la base puis herbacées vers l'extrémité (figure 1.4). Les rameaux sont courts, ascendants, très feuillés. Les feuilles sont toutes semblables, elles ont entre 5 - 7 mm de long, ovoïdes, 2 fois plus longues que larges (figure 1.5). Les fleurs sont blanches,

petites (5-6 mm), non ciliées, zygomorphes, glomérules pauciflores formant un épi court (1 - 2 cm), lâche et feuillé. Le calice est glabre, à lèvres égales, la supérieure à dents triangulaires, et la corolle est petite de couleur blanche.



Figure 1.5: *Thymus guyonii* de Noé [45].

Les étamines sont en nombre 4, droites, saillantes, écartées, discrètement divergentes, presque égales ou les inférieures plus longues [19, 20, 46, 47]. Les carpelles sont lisses. La floraison a lieu de Juin à Octobre. Le fruit est un tétrakène qui comporte à maturité 4 minuscules graines (1mm), brun clair à foncé [13].

Le thym est l'exemple même d'espèce végétale permettant d'illustrer la notion de chémotype. Il existe plusieurs races chimiques de thym dont la composition chimique de l'HE varie suivant le biotope dans lequel il évolue. Les facteurs influençant la composition et donc l'activité thérapeutique sont: l'ensoleillement, l'altitude, la nature du sol, la pureté de l'air et les précipitations [4]. Si l'on choisit les critères qui minimisent la variabilité, les données disponibles rapportent 215 espèces pour le genre *Thymus* [33].

2.4 Origine, habitat et répartition

Le thym est originaire des régions méditerranéennes, à l'ouest de l'Europe, jusqu'au sud de l'Italie. Il nécessite des endroits ensoleillés et supporte relativement bien la sécheresse. C'est d'ailleurs sur les sols pauvres que se développe au mieux son arôme [13].

Plusieurs espèces de thym poussent largement dans le vieux continent et la région ouest de la méditerranée (figure 1.6), qui est le centre où se développe le genre *Thymus*. La plante est très répandue dans le nord ouest Africain, ainsi que

dans les montagnes d'Ethiopie, les montagnes d'Arabie du sud ouest, passant par les régions arides de l'Asie occidentale. Dans le nord, il pousse en Sibérie et en Europe nordique [48, 49].

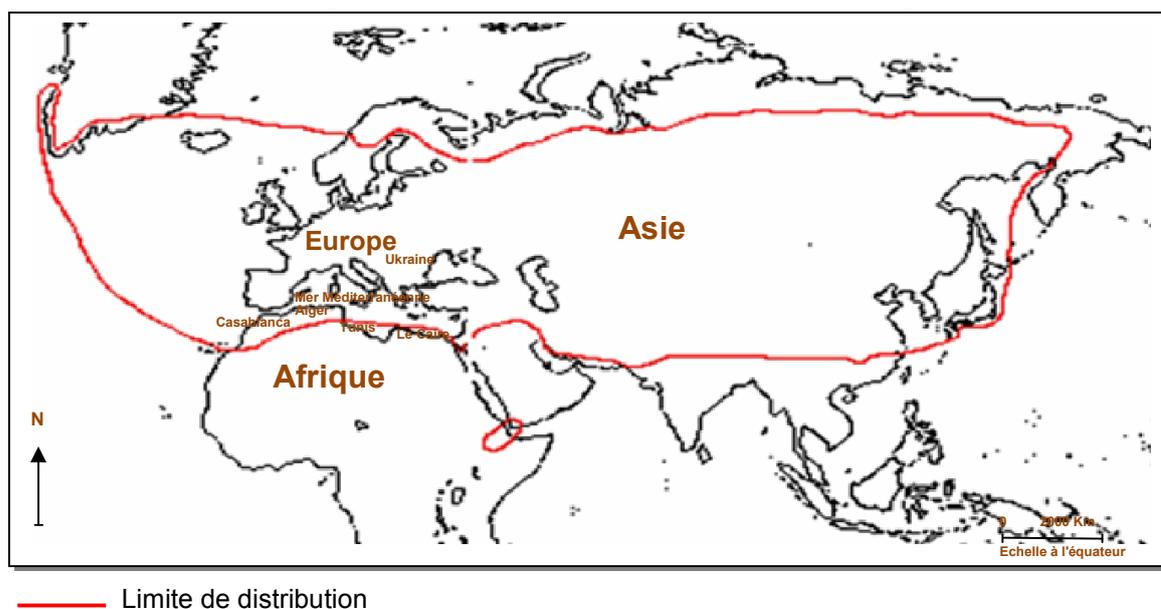


Figure 1.6: Répartition géographique du thym dans le monde (33).

Plusieurs espèces de thym sont distribuées du nord Algérois à l'Atlas Saharien, et du Constantinois à l'Oranais (tableau 1.2) [48, 19, 33]. Parmi les 12 espèces citées par les auteurs, 5 ne figurent pas dans le tableau telles que: *T. commutatus* (Ball.) Batt., *T. capitatus* (L.) Hoffm. et Link., *T. pallidus* Coss., *T. glandulosus* Coss., *T. hirtus* Willd. A l'exception de *Thymus hirtus* les 4 premières espèces ont été identifiées comme rares.

Tableau 1.2 : Principales localisations géographiques du thym en Algérie [33].

Espèces	Sections	Localisation et caractéristiques des l'espèces
<i>T. pallescens</i> de Noé (<i>T. fontanesii</i> Boiss et Reuter)	Section VII <i>Hypbodromi</i> (A. Kerner) Halácsy. Subsect. VII 3. <i>Thymbropsis</i> jalas ex R. Morales	- Commune dans le Tell - Endémique Algérienne.
<i>T. broussonetii</i> Boiss. Subsp. Broussonetti	Section VII. <i>Hypbodromi</i> (A. Kerner) Halácsy Subsect. VII 3. <i>Thymbropsis</i> jalas ex R. Morales	- Endémique Algéro- Marocaine.
<i>T. lanceolatus</i> Desf.	Section VII. <i>Hypbodromi</i> (A. Kerner) Halácsy Subsect VII 3. <i>Thymbropsis</i> jalas ex R. Morales	Rare dans: - Le sous secteur de l'Atlas Tellien (Terni) et de l'atlas Tellien (Médéa, Benchicao). - Le sous secteur des hauts plateaux Algérois, Oranais (Tiaret) et Constantinois. - Endémique Algérienne.
<i>T. dreatensis</i> Batt	Section VIII. <i>Serpyllum</i> (Miller) Bentham Subsect.VIII1. <i>Insulares</i> Jalas	- Très rare dans le sous secteur du Tell Constantinois et de la petite Kabylie. Endémique Algérienne.
<i>T. numidicus</i> Poiret	Section VII. <i>Hypbodromi</i> (A. Kerner) Halácsy Subsect. VII 3. <i>Thymbropsis</i> Jalas ex R. Morales	- Assez rare dans le sous secteur de l'Atlas tellien, le secteur du Tell Constantinois et la petite et grande Kabylie. -Endémique Algéro-Tunisienne
<i>T. guyonii</i> de Noé	Section VIII. <i>Serpyllum</i> (Miller) Bentham Subsect. VIII 1. <i>Insulares</i> Jalas	- Rare dans le sous secteur des hauts plateaux Algérois, Oranais et Constantinois. - Endémique Algérienne.
<i>T.algériensis</i> Bois et Reuter	Setion VII <i>Hypbodromi</i> (A.Kerner) Halácsy Subsect. VII 1. <i>Subbracteati</i> (Klokov) Jalas	- Très commun dans toutes les régions montagneuses et rare ailleurs. - Espèce Nord Africaine (Algérie, Maroc, Tunisie, Libye). - nombre de chromosomes: 2n= 30,56
<i>T. munbyanus</i> subsp. munbyanus Desf	Section V. <i>Pseudothymbra</i> Bentham Subsect. V 1. <i>Pseudothymbra</i> (Bentham) R. Morales	- commune dans les montagnes du nord. - Endémique Algéro-Marocaine.
<i>T. bleicherianus</i> Pomel	Section V. <i>Pseudothymbra</i> Bentham Subsect.V1. <i>Pseudothymbra</i> (Bentham) R. Morales	- Endémique Algéro-Marocaine. - Nord-Est 400-450m d'altitude.
<i>T. widenowii</i> Boiss	Section VI. <i>Thymus</i> Subct. VI 2. <i>Thymus</i>	- Espagne (Gibraltar), Maroc, Algérie. - Commune sur les montagnes du Nord jusqu'à une altitude de 1200-2400m. Nombre de chromosomes: 2n=30
<i>T. heymalis</i> Lange Subsp. fumanifolius (Paul) R. Morales	Section VI. <i>Thymus</i> Subct. VI 2. <i>Thymus</i>	- Endémique Algéro-Marocaine. - Cotes du Nord-Est jusqu'à une altitude de 100m.

2.5 Culture, récolte et parties utilisées

Le thym (*Thymus vulgaris* L.), qui est un sous-arbrisseau des garrigues méditerranéennes, est cultivé dans les jardins surtout comme condiment [50]. Il préfère la partie la plus ensoleillée du jardin, là où le sol est bien drainé, même sec et peu calcaire [51]. Par contre, le thym d'Espagne (*Thymus zygis* L) des régions arides, contient jusqu'à 1% d'essence, est utilisé industriellement pour l'extraction du thymol qui en constitue 50%. Chez une autre espèce méditerranéenne *Thymus capitatus* Hoffm du Sinai, comme chez le *T. broussonetii* Boiss du Maroc, la proportion des phénols est inversée et l'essence contient principalement du carvacrol, d'un intérêt commercial beaucoup moindre que le thymol [50].

Les feuilles et les sommités fleuries sont les parties de la plante les plus utilisées, elles sont récoltées au moment de la pleine floraison (Juin-Juillet), la deuxième récolte est possible dans les premiers jours de Septembre [52]. Les tiges sont réunies en bouquets, qui sont suspendus dans des locaux secs et bien aérés [53].

2.6 Utilisation culinaire et thérapeutique

En cuisine, le thym fait partie du bouquet garni et aide à la digestion des corps gras [5], il est très apprécié dans bien des plats en tant qu'herbe aromatique et également excellent, grâce à ses propriétés conservatrices, dans les préparations destinées à conserver des mets [42]. Le thym a été généralement considéré comme GRAS (Generally Recognized as safe), qui veut dire sécuritaire sans danger par la FDA (Food and Drug Administration) [54].

Les composés nutritionnels et les valeurs ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity: capacité d'absorption des radicaux oxygénés) du thym sont donnés dans le tableau 1.3.

Tableau 1.3: Composition nutritionnelle et valeurs ORAC du thym sec [55].

Nutriments	Valeur/ 100g
Eau	7,79g
Energie	276Kcal
Protéines	9,11g
Lipides totaux	7,43g
Carbohydate	63,94g
Fibres	37,0g
Sucres	1,71g
Calcium, Ca	1,890mg
Vitamine C (acide ascorbique totale)	50,0mg
Vitamine B-6	0,550mg
Vitamine B-12	0,00mg
Vitamine A, RAE	190mg
Vitamine A, IU	3,800UI
Vitamine E (alpha-tocopherol)	7,48mg
Vitamine D	0 UI
Acides gras totalement saturés	2,730g
Acides gras totalement mono-insaturés	0,470g
Acides gras totalement poly-insaturés	1,190g
H-ORAC (fraction hydrophile)	137,720µmol TE
L-ORAC (fraction lipophile)	19,660 µmol TE
ORAC total	157,380 µmol TE
TP (Phénols totaux)	4,470 mg GAE

Source: USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24 (2011).

GAE: acide gallique équivalent et TE: trolox équivalent/ 100g.

La note explicative de l'agence du médicaments (1998) admet pour les sommités fleuries et feuilles les indications thérapeutiques suivantes [13].

➤ En usage interne

Traitement symptomatique de la toux, de troubles digestifs (ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations, flatulence.

➤ En usage externe

Traitement des petites plaies après lavage abondant, contre le rhume. Elles sont antalgiques dans les affections de la cavité buccale et/ou du pharynx, en bain de bouche.

2.7 Composition chimique des huiles essentielles

L'huile essentielle de thym présente plusieurs variations, qui sont principalement pédoclimatique, génétique, elle résulte aussi de la saison de cueillette. Le thymol et le carvacrol viennent au premier rang, on les retrouve dans 77 et 73 taxons respectivement. Les rangs occupés par les hydrocarbures monoterpéniques: p-cymène (56 taxons) et α -terpinène (38 taxons), ne peuvent pas être considérés indépendamment de la présence du thymol et du carvacrol. En effet, les quatre terpènes sont étroitement liés par un processus biosynthétique et sont considérés comme étant les précurseurs biologiques des deux phénols. Par conséquent, on les rencontre simultanément dans les huiles essentielles du thym. Le plus souvent, les deux phénols sont les plus abondants que leurs précurseurs. Dans quelques huiles essentielles, c'est le cas opposé qui a lieu et on retrouve le p-cymène ou α -terpinène comme le composé principal [33].

3. Méthodes d'extraction et conservation des huiles essentielles

De multiples méthodes d'extraction d'HE sont utilisées. L'extraction à la vapeur d'eau représente 80% des méthodes de récupération d'huiles essentielles.

Les techniques les plus habituelles sont:

3.1 Hydrodistillation

Le principe de ce procédé consiste à immerger le matériel végétal à traiter dans un ballon rempli d'eau ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes (eau + molécules aromatiques) sont condensées en passant dans un serpentin du réfrigérant et redeviennent liquide et réuni dans une ampoule à décanter ou dans un essencier. L'huile essentielle et l'hydrolat vont se fractionner naturellement, l'HE reste en surface qui sera décanter puis filtrée [56].

3.2 Entrainement à la vapeur d'eau

Durant le passage de la vapeur à travers le matériel végétal, les cellules éclatent et libèrent l'HE qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange «eau + HE» [57].

3.3 Hydrodistillation par micro-ondes sous vide

Dans ce procédé récent, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-ondes sous vide, l'HE est entraîné dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée. Cette méthode est très rapide et consomme très peu d'énergie (temps de travail divisé par 5 à 10, températures plus basses) [58].

3.4 Extraction par solvants

Certaines HE ont une densité voisine de l'eau et le procédé par distillation à la vapeur d'eau ne peut être utilisé. Dans ce cas des solvants sont souvent utilisés pour extraire l'HE [59, 60].

3.5 Extraction au CO₂ supercritique

Quand le CO₂ se trouve entre l'état liquide et l'état gazeux en conditions de températures de (31±1°C) et sous pression, il est capable de dissoudre de nombreux composés organiques et extraire les huiles essentielles [61].

3.6 Conservation des huiles essentielles

L'HE est naturellement volatile, fragile et instable. Elle doit être conservée à l'abri de la lumière, chaleur et à l'air dans un flacon sec et propre en acier inoxydable, en aluminium ou en verre teinté anti-actinique, presque entièrement rempli et fermé de façon étanche (l'espace libre étant rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte) [62]. En général, le délai de conservation peut aller de 6 mois à 3 ans, selon la nature de l'HE et la qualité de conservation (règles d'emballage, de conditionnement et de stockage) AFNOR NFT 75-001, (2000) et règles de marquage de récipients selon AFNOR NFT 75-002 (2000) [63].

4. Analyse des huiles essentielles

Après extraction des HE, il est nécessaire de déterminer leur composition chimique ainsi que leurs propriétés physico-chimiques. L'analyse est réalisée de manière qualitative par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et semi-

quantitative par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

Cependant certains composés ne sont pas facilement séparés qu'on ne peut pas identifier par CPG, ce sont des molécules de structure similaire comme les composés stéréoisomériques des HE qui seront analysés par la résonance magnétique nucléaire du carbone-13 (RMN) [64, 65,66,67,68].

5. Activités pharmacologiques des huiles essentielles

5.1 Activité antioxydante

Les HE de plantes aromatiques comme celles de l'origan et du thym possèdent de puissants composés antioxydants [69]. Le carvacrol et le thymol sont les composés les plus actifs. Leur activité est due à leur structure phénolique qui a des propriétés oxydo-réductrices. Ainsi, ils neutralisent les radicaux libres et décomposent les peroxydes [70].

5.2 Activité antimicrobienne

Les huiles essentielles d'origan, thym, sauge, romarin et clou de girofle ont des propriétés antibactériennes et antifongiques importantes et ont une particularité d'être riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol [71]. L'eugénol, thymol et carvacrol ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritica*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus sake*, *Staphylococcus aureus* et *Helicobacter pylori* [72]. Les trois composés cités sont aussi de très bons agents antifongiques contre une large gamme de champignons : *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* et bien d'autres [73].

5.3 Activité cicatrisante

Les HE sont des mélanges de terpènes (mono-, di- ou sesquiterpènes) et de dérivés terpéniques oxygénés (alcool, aldéhyde, cétone, acide, ester). Les activités principales des HE sont antiseptiques et cicatrisantes.

Elles favorisent aussi la pénétration cutanée par leur caractère solvant des lipides épidermiques intercellulaires [74]. Par conséquent, lorsque sur une partie

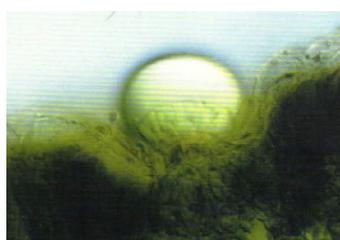
du corps douloureuse, l'on applique une HE, celle-ci grâce à son pouvoir de propagation très élevé, va agir directement sur l'organe malade situé en dessous, ce qui évite de surcharger inutilement les organes internes tels que le foie et les muqueuses digestives.

Dans le même temps, l'HE rejoindra aussi, à travers le sang, les autres parties du corps et se diffusera dans toutes les cellules, les revitalisants, les tonifiants, augmentant les défenses immunitaires et améliorant les fonctions des différents appareils [75].

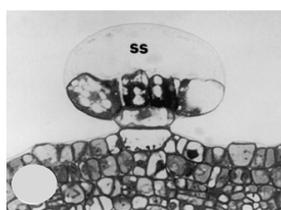
Grâce aux qualités antiseptiques des huiles essentielles qui entrent dans la composition des formes galéniques à utilisation topiques. Les problèmes de conservation de ces formes sont moins importants. Le vieillissement lent permet une durée de conservation de deux à cinq ans [76].

6. Localisation cellulaire des huiles essentielles de l'origan et du thym

L'origan et le thym possèdent des trichomes glandulaires, qui sont des modifications des poils épidermiques. Ils sont présents à la surface supérieure et inférieure de la feuille, tige et fleur. Chaque trichome glandulaire est composé de 10 à 14 cellules sécrétrices d'huiles essentielles. Elles sont attachées à l'épiderme par une cellule basale, la surface externe du trichome est cutinisée et l'huile essentielle s'accumule dans la cavité sub-cuticulaire. La cellule basique forme un obstacle et permet l'écoulement des HE produites vers la cavité de stockage. (Figure 1.7: a, b et c).

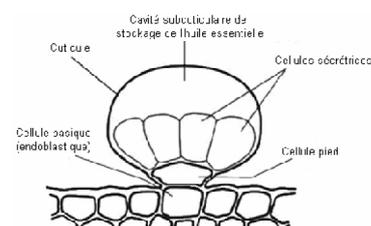


a- Espace sub-cuticulaire rempli d'HE.



b- Structure schématisée du trichome.

ss: subcuticular space: espace subcuticulaire



c-Anatomie du trichome glandulaire.

Figure 1.7 : Coupe transversale des feuilles d'*Origanum heracleoticum* (Gr x 420) (a), *Origanum vulgare* (Gr x 500) (b) et *Thymus vulgaris* (c) [34, 43, 77].

MATERIEL ET METHODES

Chapitre II: Matériel et Méthodes

2.1 Matériel biologique utilisé

Durant notre expérimentation nous avons utilisé de la matière végétale d'*Origanum floribundum* Munby (origan) et *Thymus guyonii* de Noé (thym), des souches microbiennes et de petits animaux de laboratoire.

2.1.1 Description d'*Origanum floribundum* Munby et *Thymus guyonii*

Notre étude s'est porté sur deux plantes endémiques et rares d'Algérie, appartenant à la famille des Lamiaceae.

2.1.1.1 *Origanum floribundum* Munby est une plante qui peut atteindre un mètre de haut ou plus, avec tiges décombantes et prostrées (figure 2.3) et (figure 2.4).

2.1.2.2 *Thymus guyonii* de Noé C'est une plante à tige légèrement prostrée, rampante (figure 2.5) et (figure 2.6).



Figure 2.1: Tiges décombantes et prostrées d'*Origanum floribundum* (originale, 2014).



Figure 2.2: Inflorescences d'*Origanum floribundum* (originale, 2014).

2.1.2 Site de prélèvement des plantes étudiées

Le site de prélèvement de l'origan se situe dans les montagnes de Hammam Melouane à 950m d'altitude (w. Blida) à 50 km d'Alger. Il englobe la partie centrale

du parc de Chr ea, où pousse *Origanum floribundum*   l'état spontané (tableau 2.1) avec un climat méditerranéen (classification de Köppen CSA) [78] et (Figure 2.1).

Le sol est siliceux, pH acide et pauvre en calcaire.

Le *Thymus guyonii* se trouve dans les montagnes de Sidi Bouzid   Aflou (w. Laghouat)   1405 m d'altitude et à 400km d'Alger avec un climat semi-aride (classification de Köppen BSK) [78] (tableau 2.1) et (Figure 2.2) et le sol est calcaire, argilo- sableux.

Tableau 2.1:Caractéristiques des régions de récolte (sites de prélèvements) [79,80,81]

Plante et Région	Altitude	Latitude Nord	Longitude Est	Etage bioclimatique	Précipitation annuelle	Température (moyenne annuelle)
<i>Origanum floribundum</i> Munby de Hammam Melouane	950m	36�27'	2�52'	Sub-humide � hiver froid	873mm	19,04�C
<i>Thymus guyonii</i> de No� de Sidi Bouzid Aflou (Laghouat)	1405m	34�20'59"	2�15'43"	Sec � été chaud et hiver froid	207mm	13,63�C



Figure 2.3: Vue générale des montagnes de Hammam Melouane



Figure 2.4: Vue générale d'une étendue de thym à Sidi Bouzid.

(originale, Juin 2014)



Figure 2.5: Tiges prostrées et rampantes de *Thymus guyonii* (originale, 2014).



Figure 2.6: Inflorescence de *Thymus guyonii* (originale, 2014).

2.1.3 Récolte des plantes

La récolte des organes (tiges, feuilles et fleurs) est faite au début de la floraison des plantes, aléatoirement sur une étendue d'environ 1ha d'origin de Hammam Melouane au mois de Juin 2014. Nous avons procédé de la même manière pour l'espèce *Thymus* au niveau de Sidi Bouzid à Aflou (Laghouat).

L'identité, la nomenclature et la systématique des plantes ont été confirmées au niveau de l'ENSA (Ecole Nationale des Sciences Agronomiques d'El-Harrach Alger) et à l'université de Blida 1 par des chercheurs du département de botanique, et ce en comparaison avec l'identification et la description des plantes décrites par Quezel et Santa [19].

Une partie du matériel végétal a été conservée à l'état frais pour déterminer le taux d'humidité, ainsi que des mesures (longueur et largeur) sur des tiges, feuilles et fleurs à raison de 50 par organe. L'autre partie a été séchée à l'air libre dans un endroit sec, à l'abri de la lumière et de l'humidité à température ambiante de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.1.4 Animaux de laboratoire

Les expérimentations pharmaco-toxicologiques ont été faites sur des lapins albinos mâles et femelles de 2,5-3kg (souche Néozélandaise) et rats albinos mâles et femelles de 200g (Whistar) provenant de l'animalerie du CRD-SAIDAL d'El Harrach.

2.1.5 Matériel bactériologique

Les souches utilisés sont au nombre de onze (11), provenant du laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL d'El Harrach, il s'agit de : *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 Méthode d'étude

L'expérimentation s'est déroulée au niveau des laboratoires de recherche :

- Unité de recherche en Biotechnologies végétales du département de Biologie, Université Saad Dahleb de Blida 1.
- Laboratoires des huiles essentielles, microbiologie, chimie analytique, pharmacie galénique et pharmacotoxicologie du CRD-SAIDAL d'El Harrach.
- Centre de recherche scientifique & technique en analyses physico-chimiques (CRAPC), zone industrielle de Bousmail (Tipaza).
- Laboratoire centrale, unité de bactériologie EPH de Koléa.
- Laboratoire anatomie pathologique unité histologie et cytologie EPH de Koléa.

2.2.1 Aspect macro et microscopique

Dans le but de reconnaître les organes des plantes étudiées et de localiser les sites sécréteurs d'huiles essentielles, nous avons réalisé des observations des organes végétatifs et reproducteurs à la loupe (Gr x 0,8 et x 2,5) x10 et au microscope photonique (Gr x 4 x 10 et x 40) x10.

2.2.1.1. Observation à la loupe

L'observation des plantes à la loupe a été faite afin d'identifier les différents organes des appareils végétatifs et reproducteurs des plantes et de situer les poils tecteurs et sécréteurs visibles à la loupe (type Motic).

2.2.1.2. Observation au microscope

Dans le but de révéler les sites sécréteurs d'huiles essentielles (HE), des coupes histologiques à main levée ont été effectuées au niveau des tiges et feuilles. Nous avons utilisé la technique de double coloration (vert de méthyl et

rouge congo) [82]; (Appendice D₂). Un montage des coupes dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle est observé immédiatement au microscope photonique (Gr x 4 x 10 et x 40 x10), doté d'un appareil photo type Motic (au niveau du laboratoire de recherche de biologie végétale du département de Biologie de l'université Saad Dahleb de Blida 1).

Des coupes histologiques au microtome ont été également effectuées au niveau de la tige, feuille et pétiole au niveau du laboratoire anatomie pathologique, suivant un protocole courant des plantes [83] (voir Appendice D₁), puis nous avons coloré les coupes par la double coloration Carmino-vert [82]. Plusieurs coupes ont été préparées et observées.

2.2.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des HE a été réalisée par hydrodistillation (méthode recommandée par la pharmacopée Européenne) [84]. Un extracteur pilote «Alambic semi-industriel» a été exploité. Il est constitué de quatre parties : la chaudière, la corbeille, le réfrigérant et l'essencier (Appendice C₂).

2.2.2.1 Protocole d'extraction

Les HE sont obtenues après extraction d'une quantité de 10Kg de matière végétale sèche constituée de parties aériennes fleuries est ramassée dans la corbeille qui est placée dans la chaudière. Un volume d'eau déterminé a été additionné (environ 100 litres) et la température de l'appareil a été réglée à $101 \pm 5^\circ\text{C}$ pour favoriser un maximum d'évaporation de l'eau et des HE sans les dénaturer et ceci grâce à un système de chauffage électrique.

En chauffant, l'eau s'est évaporée s'était chargée d'HE, a migré vers le serpent à l'intérieur du réfrigérant contenant de l'eau froide qui circulait en continu grâce à un système de circuit fermé, de sorte à ce que les températures avoisinent les $12-13 \pm 2^\circ\text{C}$. Les vapeurs saturées d'HE, se condensent en liquide puis ont été récupérées dans l'essencier après une heure d'extraction.

Les HE ont été collectées en premier en ouvrant le robinet de l'essencier ensuite la deuxième séparation d'HE (phase organique) de l'hydrolat (phase aqueuse) se fait avec une ampoule à décanter de 200ml, une décantation simple sans

solvant a été effectuée (Appendice C₃). Les HE ont été pesées pour le calcul du rendement puis conservées au frais (+4 ± 2°C), dans un flacon en verre ombré et hermétiquement fermé. Des analyses ont été effectuées sur ces huiles.

2.2.2.2. Calcul du rendement

Le rendement en HE est indiqué comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée (MHE) et la masse de la matière végétale sèche (MVS), exprimées dans la même unité de masse multiplié par 100 [85], comme suit :

$$\text{Rdt}\% = (\text{MHE} / \text{MVS}) \times 100$$

2.2.2.3. Détermination du taux d'humidité

Pour la détermination du taux d'humidité ou la teneur en eau dans la matière végétale, nous avons utilisé l'appareil Dean et Starck (Appendice C₄)

Le mode opératoire de la technique suit les étapes suivantes :

- Introduire 10gr de la matière végétale dans un ballon contenant 200ml du toluène (la plante doit être immergée complètement).
- Surmonter le ballon d'un réfrigérant, ce dernier est équipé d'un tube collecteur gradué.
- Maintenir à ébullition (2 à 3 gouttes par seconde), jusqu'à ce que la plus grande partie de l'eau soit entraînée (niveau d'eau constant) et le solvant devient limpide ce qui correspond à 24 heures.
- Evaluer le taux en humidité de la matière végétale selon la formule suivante [84].

$$\text{H} (\%) = (\text{V}/\text{M}) \times 0,998 \times 100.$$

où

H: taux d'humidité (%).

V : volume d'eau (ml).

M : Masse : masse de la matière végétale (fraîche ou sèche) en gr.

0,998 : densité d'eau.

2.2.2.4. Etude de la cinétique de l'extraction par hydrodistillation

Dans l'objectif de déterminer le temps d'extraction des HE de l'origan et du thym, nous avons étudié la cinétique de l'extraction de ces plantes sèches.

Nous avons utilisé le dispositif d'hydrodistillation à l'échelle laboratoire pour réaliser cette technique (Appendice C₅). Elle consiste à :

- Mettre 100g de matière végétale dans un ballon de 2 litres, ajusté avec 2/3 d'eau qui est raccordé à un réfrigérant.
- Chauffer jusqu'à ébullition avec un chauffe ballon.
- Le mélange de vapeur d'eau et d'HE obtenues, est condensé et refroidi à une température ambiante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Récupérer les distillats dans des Erlenmeyers à des intervalles de temps successifs.
- Séparer l'HE de la phase aqueuse par décantation avec une ampoule à décanter en additionnant un solvant organique (le diéthyl-éter).
- En cas d'une mauvaise séparation des deux phases, ajouter du chlorure de sodium (NaCl).
- Enlever la phase aqueuse et récupérer la phase organique filtrée avec un papier filtre contenant un sel de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) utile à piéger les molécules d'eau. Cette fraction est mise dans des tubes à essais préalablement pesés.
- Déposer les tubes à essai ouverts à l'air libre, à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'à évaporation complète de l'ether diéthylique, puis peser.
- Ces échantillons séquentiels de distillats procédés à différents intervalles de temps, nous ont permis d'établir la courbe du rendement en fonction du temps d'extraction [86, 87].

2.2.3. Caractérisation des huiles essentielles

La caractérisation des HE d'origan et de thym consiste à :

- Evaluation des caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur et flaveur).
- Obtention des indices physico-chimiques (densité, indice de réfraction, indice d'acide, pouvoir rotatoire, indice d'ester et miscibilité à l'éthanol).
- Acquisition des profils chromatographiques et une quantification relative des différents constituants [49].

2.2.3.1. Indices physico-chimiques

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles mentionnées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) [49].

2.2.3.1.1. Densité relative

Elle est indiquée comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'HE à 20°C, à la masse d'un égal volume d'eau distillée à la même température. Cette valeur est sans dimension symbolisée par : d_{20}^{20} , elle se mesure à l'aide d'un pycnomètre selon la norme NF T 75-11 [49].

2.2.3.1.2. Indice de réfraction

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un réfractomètre de type Bellinghame. Quand la détermination est faite à une température (T°C) différente de 20°C, on effectue la correction à 20°C selon la norme NF T 75-112 [49].

2.2.3.1.3. Pouvoir rotatoire

Il s'agit de l'angle exprimé en milli-radians, révélant la déviation de plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde $589,3 \pm 0,3$ nm, concordante aux raies D du sodium, lorsque celle-ci traverse une épaisseur de 100 mm de l'HE dans des conditions déterminées de température selon la norme NF T 75-113 [49].

2.2.3.1.4. Miscibilité à l'éthanol

Selon AFNOR, une huile est dite miscible à V volume et à la température de 20°C, lorsque le mélange d'un volume d'huile essentielle considérée avec V volume de cet éthanol, est limpide et le demeurera même après l'addition graduelle d'éthanol de même titre, jusqu'à 20 volumes selon la norme NF T 75-101 [49].

2.2.3.1.5. Indice d'acide

L'indice d'acide IA est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH), essentiel à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle selon la norme NF T 75-103 [49].

2.2.3.1.6. Indice d'ester :

L'indice d'ester IE est le nombre de milligrammes d'hydroxydes de potassiums indispensables à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle selon la norme NF T 75-104 [49].

2.2.3.2. Analyse qualitative et semi-quantitative des HE par CPG / CG-SM

Cette analyse a été effectuée au laboratoire de chromatographie au centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimiques (CRAPC) de la zone industrielle de Bousmail Tipaza selon les conditions opératoires suivantes :

2.2.3.2.1. Chromatographie phase gazeuse(CPG)

- Appareil de type GC 6890 séries GC-FID (Hewlett-Packard).
- Colonne : HP5MS (5% polysiloxane) ; longueur : 30m ; diamètre: 0,25µm, avec une épaisseur du film de la phase : 0,25µm.
- Programmation de la température à 60°C en isotherme pendant 8min puis une augmentation de la température à raison de 2°C/min jusqu'à 280°C et ensuite laissée en isotherme pendant 15min.
- Des échantillons dilués (1/10 hexane, v/v) de 0,2µl ont été injectés dans le mode d'injection Split avec le rapport de division de 1:25. L'injection a été réalisée à T= 250°C.
- Un débit de 0,5 ml/min de gaz vecteur (N₂) a été utilisé.
- La détection d'ionisation de flamme a été effectuée à 320°C.
- Les données quantitatives ont été obtenues par voie électronique à partir des pourcentages des aires.

2.2.3.2.2. Analyse par CG-SM

- Appareil informatisé: Hewlett-Packard (chromatographe en phase gazeuse 6890 couplé à un spectromètre de masse 5973A).
- Colonne apolaire HP5MS (film 30mx0,25mmx0,25µm épaisseur).
- Gaz vecteur: hélium (He) à un débit de 0,5ml/min.
- Mode d'injection Split (1:25); volume injecté 0,2µl (1/10 dans l'hexane, v/v); et T: 250°C comme température d'injection.
- Programme du four 60°C pendant 8min, augmentant à 2°C/min jusqu'à 280°C et isotherme pendant 15min.
- Mode d'ionisation avec impact électronique à 70ev a été utilisé pour une plage de balayage de 30 à 550 unités de masse atomique.

2.2.3.2.3. Mode d'identification

Les constituants de l'huile ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention de Kovats déterminés par rapport à une série de n-alcanes C₇-C₁₇ (injectée dans les mêmes conditions) avec ceux de la littérature.

Les indices de rétention désignés par IR ont été calculés selon la formule suivante :

$$IR = 100z + 100n \cdot \frac{t_{RC} - t_{Rz}}{t_{Rz+n} - t_{Rz}}$$

où t_{RC} : temps de rétention du composé analysé.
 t_{Rz} : temps de rétention de l'alcane à z atomes de carbones qui précède le composé étudié.
 t_{Rz+n} : temps de rétention de l'alcane à z+n atomes de carbones qui suit le composé.
 n : différence des nombres d'atomes de carbone.

L'identification des constituants des HE extraites est fondée sur :

- La comparaison des spectres de masses des molécules inconnues à ceux des composés purs mentionnés par la littérature.
- En tenant compte de l'ordre d'élution du composant sur la colonne considérée.
- En tenant compte de la proposition et du pourcentage de probabilité de l'existence du composé fournis par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse des banques de spectres de la National Institute of Standard Technology (NIST 2005 et de la Wiley 7N).

- Comparaison des indices de rétentions en programmation de température à ceux désignés par la littérature sur le même type de colonne [33].

2.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des HE d'origan et thym a été effectuée in vitro par deux méthodes citées par la littérature [88,89] : le pouvoir réducteur et l'activité d'inhibition du radical DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl). Le pouvoir antioxydant des HE expérimentées a été apprécié par comparaison avec un antioxydant de synthèse qui est le BHT et antioxydant naturel (α -tocophérol).

2.2.4.1. Mesure du pouvoir piégeage du radical DPPH[•]

La méthode a été faite suivant le principe et protocole suivants:

2.2.4.1.1. Principe

La capacité de donner des hydrogènes par les HE ou par certains composants purs, est mise en évidence par un procédé spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'un solvant polaire comme l'éthanol contenant le radical libre DPPH[•] (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) à température ambiante.

Dans ce test le piégeage du radical DPPH[•] est accompagné par la diminution de l'absorbance à 517nm qui est due à la réduction du radical par l'antioxydant (AH) renfermé dans les échantillons (Figure 2.7).

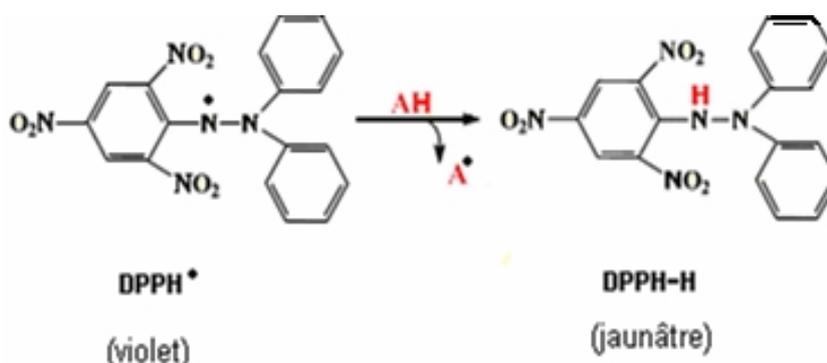


Figure 2.7 : Réaction du radical DPPH avec un antioxydant AH.

2.2.4.1.2. Mode opératoire

La solution de DPPH a été étudiée à une concentration de 60 µM dans l'éthanol absolu. Le test du DPPH a été accompli en suivant la méthode décrite par Cuendet et *al.*, [88], Burits et Bucar [89], où 25 µl de chacune des dilutions des HE testées et de certains composés purs tels que le BHT ont été mélangés dans la cellule placée dans la cuvette de spectrophotomètre avec 975 µl de la solution éthanolique de DPPH (60µM).

Après une période d'incubation de 30 mn à l'abri de la lumière et de l'oxygène atmosphérique et à la température ambiante de laboratoire, l'absorbance a été lue à 517 nm.

1. Les expériences ont été réalisées en 3 répétitions pour chaque concentration.
2. Le BHT et le tocophérol ont été utilisés comme témoins (référence de comparaison).
3. Le pourcentage d'activité (I %) a été donné par la formule suivante :

$$I(\%) = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{ech}}) / (A_{\text{blanc}})] \cdot 100$$

Ablanc : Absorbance du témoin (nm), il désigne l'absorbance du DPPH au temps zéro avant l'ajout de l'échantillon (HE ou témoin) à une concentration précise.

Aech : Absorbance de l'échantillon expérimenté après 30mn.

2.2.4.1.3. Détermination de la concentration inhibitrice

Elle est indiquée comme étant la quantité où la concentration d'antioxydants (HE ou toute autre substance employée comme antioxydant) nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux (IC₅₀).

La IC₅₀ est la concentration essentielle pour obtenir une activité en % égale à 50. Elle est acquise à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant.

2.2.4.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur mesure l'aptitude de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}), donc la mesure de l'aptitude d'une HE à interagir avec les particules chimiques réactives (couleur jaune), étant que donneur d'électrons tels que les radicaux libres. Ces radicaux ainsi réduits deviennent plus stables (couleur bleu vert). Le BHT, le tocophérol et l'acide ascorbique ont été pris comme antioxydants de références.

Le principe et le mode opératoire suivants:

2.2.4.2.1. Principe

La capacité des HE à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure Fe^{+3} en Fer ferreux (Fe^{+2}), a été évaluée par la méthode décrite par Oyaizu [90].

2.2.4.2.2. Mode opératoire

L'appréciation du pouvoir réducteur des échantillons étudiés des huiles essentielles de l'origan et du thym en comparaison avec les antioxydants de références (BHT, tocophérol et acide ascorbique) a été obtenue selon le protocole expérimental de la figure 2.8.

L'augmentation de l'absorbance indique un accroissement du pouvoir réducteur. L'expérimentation a été répétée 3 fois pour chaque échantillon étudié.

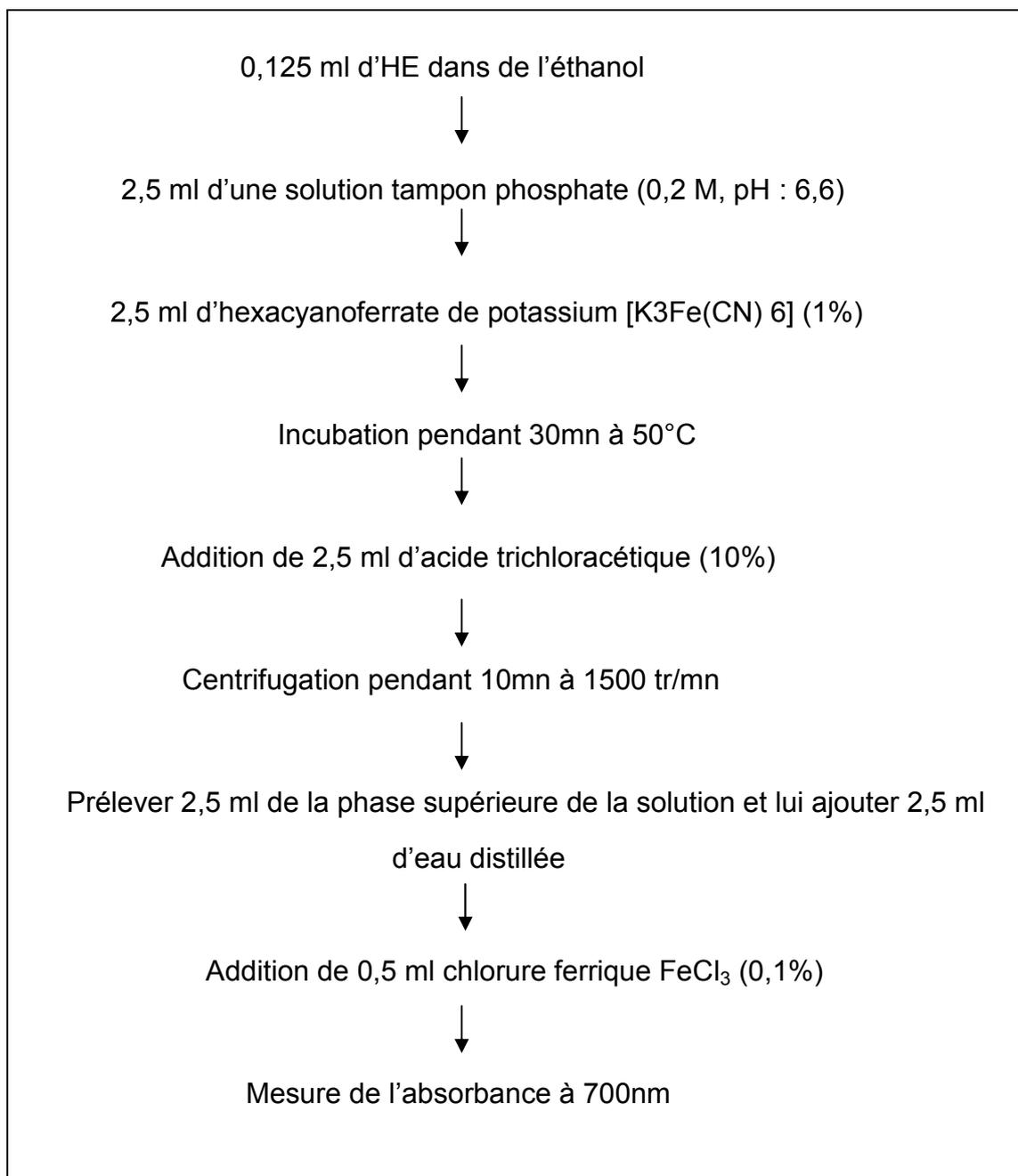


Figure 2.8 : Procédé de la mise en œuvre du test du pouvoir réducteur.

2.2.5. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Pour mettre en évidence le pouvoir antiseptique des HE d'origan et du thym, nous avons utilisé deux méthodes qualitative et quantitative, en pratiquant des tests sur une sélection de souches de référence bactérienne et fongique connues et la plupart d'eux certifiées comme dangereuses pour l'homme et l'animal.

Les expérimentations ont été réalisées au niveau du service de microbiologie du laboratoire central de Koléa et au CRD-SAIDAL (El Harrach, Alger). Le principe des méthodes est obtenu à partir du titrage des antibiotiques « Pharmacopée Européenne, 2002 », les modes opératoires quand à eux, ont été approuvés par la direction du laboratoire de Microbiologie du CRD-SAIDAL [84].

2.2.5.1. Etude qualitative de l'effet antimicrobien

L'aromatogramme ou méthode de diffusion sur milieu gélosé a été utilisé par plusieurs chercheurs notamment par : Zaïka et *al.*, [91], Haddouchi, Benmansour, et *al.*, [92] et Bendahou, Muselli et *al.*, [44].

2.2.5.1.1. Principe

La technique des aromatogrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose (diamètre : 6 mm) imbibé d'HE à tester (volume de 15 µl), à la surface d'une gélose préliminairement coulée dans une boîte de Pétri etensemencée avec le microorganisme testé. Après incubation, la lecture des résultats se fait par l'évaluation du diamètre (mm) de la zone claire autour du disque indemne de colonies (halo translucide), appelée : zone d'inhibition (Figure 2.9).

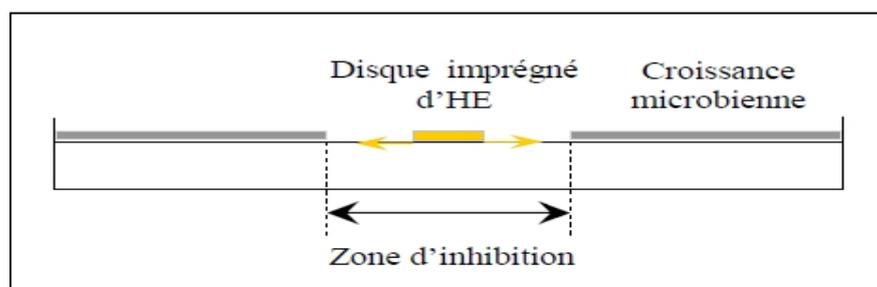


Figure 2.9 : Schéma simplifié du principe de la méthode des aromatogrammes [93].

2.2.5.1.2. Souches microbiennes testées

Les souches microbiennes qui ont été utilisées proviennent de la collection ATCC (American Type Culture Collection) du laboratoire de microbiologie du CRD, le nombre retenu est de 11 dont 09 souches bactériennes (05 Gram+ et 04 Gram-) et 02 champignons (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Caractéristiques des souches microbiennes et fongiques testées [33].

Nom de la souche	N°ATCC	Gram	Famille	Principales infections causées
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	Bacillaceae	- Gastro-entérites.
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	Bacillaceae	- Intoxications alimentaires.
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	Enterococcaceae	- Douleurs abdominales - Diarrhées aiguës. -
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	Micrococcus	- Maladies nosocomiales chez des patients immunodéprimés.
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Micrococcaceae	- Gastro-entérites. - Infections urinaires. - L'ostéomyélite et l'arthrite.
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	-	Alcaligenaceae	- Infections des voies respiratoires supérieures. - Bronchites, pneumonies.
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	Enterobacteriaceae	- Diarrhées dysentériques. - Gastro-entérites.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	Enterobacteriaceae	- Vasodilatation. - Troubles neurologiques et gastro-intestinaux. - Risques d'abcès pulmonaire.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	Pseudomonadaceae	- Crampes abdominales. - Troubles digestifs.
<i>Candida albicans</i>	24433		Cryptococcaceae	- Lésions cutanées. - Infections œsophagiennes. - Infections génitales.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601		Saccharomycetaceae	- Souche non pathogène.

2.2.5.1.3. Protocole expérimental

Durant nos expérimentations, nous avons suivi les étapes suivantes:

2.2.5.1.3.1. Préparation de l'inoculum

Les suspensions bactériennes ont été préparées par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18 h pour les bactéries et 48 h pour les levures. Elles étaient incluses ensuite dans 9 ml d'eau physiologique stérile (NaCl à 9‰), puis agiter au vortex pendant quelques secondes.

La lecture de la densité optique a été effectuée en utilisant un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620nm ; Et doit être comprise entre 0,22 et 0,32 pour les bactéries sauf pour les *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium* où la longueur d'onde est entre 0,3 et 0,4. Elle est entre 1 et 2 pour les levures, ce qui correspond à une concentration optimale de 10^7 à 10^8 germes/ml (AFNOR, 1989 [94] et Standardisation de l'antibiogramme selon l'OMS, 1999) [95].

2.2.5.1.3.2. Préparation des milieux de culture

Les milieux gélosés déjà fondus dans un bain Marie à $95 \pm 2^\circ\text{C}$ (Muller-Hinton : MH pour les bactéries et Sabouraud : SAB pour les levures), ont été versés aseptiquement dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte avec 3 répétitions par souche. Les milieux ont été refroidis et solidifiés sur une paillasse.

2.2.5.1.3.3. Préparation de la deuxième couche du milieu

Les milieux gélosés (MH et le SAB) sont fondus dans un bain Marie à $95 \pm 4^\circ\text{C}$, puis on abaisse la température jusqu'à $45 \pm 2^\circ\text{C}$ et nous avons remplis des flacons de 50ml.

Les milieux ont étéensemencés avec 200µl de chaque suspension microbienne et une agitation manuelle a été effectuée. Un volume de 4ml de chaque milieu a été inoculé sur la surface de la première couche (couche support) de gélose solidifiée. Cette couche a été étalée immédiatement en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme. Les milieux sont solidifiés sur la paillasse à température ambiante.

2.2.5.1.3.4. Dépôt des disques

A l'aide d'une pince stérile, nous avons déposé un disque de cellulose stérile (stérilisé par la lumière UV), de 6mm de diamètre sur la surface de la gélose. Nous avons déposé délicatement un volume de 15µl d'HE à tester, puis on a laissé diffuser sur la paillasse pendant 30 minutes. Des disques d'antibiotiques ont été utilisés comme contrôles positifs, il s'agit du chloramphénicol (30µg) pour les bactéries et du Ketoconazole (50µg) pour les levures. On a incubé à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures.

2.2.5.1.3.5. Lecture

Le diamètre des zones claires autour des disques (zone d'inhibition) a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

L'activité antimicrobienne de l'HE a été évaluée en fonction du diamètre des disques d'aromatogramme (mm), des zones d'inhibition de la croissance microbienne. L'estimation de l'activité antimicrobienne de l'HE est fondée sur une échelle de mesure, citée par Mutai et *al.*,(2009) [96]. Ils ont estimé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 05 classes :

- Très fortement inhibitrice, lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est ≥ 30 mm.
- Fortement inhibitrice, lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 21-29 mm.
- Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 16-20 mm.
- Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 11-15 mm.
- Peu ou pas inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est ≤ 10 mm.

2.2.5.2. Etude quantitative de l'effet antimicrobien

L'appréciation quantitative de l'activité antimicrobienne des HE d'*Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii* consiste à déterminer la concentration minimale

inhibitrice CMI et la concentration minimale bactéricide CMB et fongicide CMF sur les microorganismes testés (bactéries et levures).

2.2.5.2.1. Détermination des CMI

Le Principe de la méthode consiste à effectuer des dilutions des HE dans le milieu gélosé solide Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures, puis inoculer ce milieu avec les souches testées en utilisant des disques stériles absorbants. Grâce aux dilutions préparées, nous pouvons déterminer la plus faible concentration inhibant la croissance microbienne.

Le protocole expérimental établi est le suivant:

2.2.5.2.1.1. Préparation de l'inoculum

Nous avons préparé une série de dilution allant de 10^{-1} à 10^{-6} , à partir de jeunes cultures (18h à 24h pour les bactéries et 48h pour les levures). Par la suite, des suspensions de 10^8 germes /ml pour chaque souche testée ont été réalisées [97].

2.2.5.2.1.2. Dénombrement

- L'ensemencement en profondeur de la boîte de Pétri a été fait, pour chaque suspension microbienne par la dilution 10^{-6} à raison de 1ml par boîte.
- On a coulé les boîtes contenant les suspensions par les milieux maintenus en surfusion à 45°C , gélose trypticase soja (TSA) pour les bactéries et SAB pour les levures. Les milieux se sont solidifiés.
- L'incubation des boîtes ensemencées a été effectuée, à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures. La lecture se fait par dénombrement des colonies obtenues en utilisant un compteur de colonies.

On a appliqué la formule suivante:

$$X = N \times 1 / V \times 1 / d$$

où

X: concentration microbienne de la suspension mère.

N: nombre de colonies.

v: volume de la prise d'essai (déposé sur la boîte de pétri).

d: dilution de la suspension microbienne.

La dilution utilisée pour la détermination de la CMI est 10^{-4} germes/ml [95].

2.2.5.2.1.3. Préparation de la gamme de dilution de l'HE

Un volume de 200ml du milieu à 95°C a été liquéfié dans un bain Marie, 1ml de Tween 80 a été ajouté. Une dilution de 2% de l'HE à tester a été préparée en diluant 1ml d'huile essentielle dans 50ml du milieu. L'homogénéisation du premier flacon a été faite, puis versement de 25ml de son contenu dans un autre flacon qui a été ajusté à 50ml de milieu pour avoir la dilution 1%. On a poursuivi les dilutions jusqu'à l'obtention de la dilution 0,03%.

A partir de chaque dilution préparée, on a versé 20ml dans chaque boîte de pétri qu'on laisser les solidifier. Puis on a partagé les boîtes en deux parties :

- On aensemencé sur la première partie par spotage à l'aide d'une microseringue de 3µl des suspensions microbiennes de la dilution 10^{-4} .
- Pour la détermination des CMB et CMF, on a déposé sur la deuxième partie, les disques cellulosesiques imbibés de 3µl des suspensions microbiennes de la dilution 10^{-4} . Les boîtes ont été laissées sur la paillasse pendant 30minutes pour la diffusion. Puis on a incubé à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24h pour les bactéries et à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48h pour les levures.

2.2.5.2.1.4. Lecture

On parlera de CMI là où aucune croissance visible n'est remarquée au niveau des spots tout en sachant que l'existence d'une ou deux colonies n'est pas prise en considération [98].

2.2.5.2.2. Détermination des CMB et CMF

Après avoir repérer des disques où aucune croissance n'était présente lors de la détermination des CMI, les manipulations se poursuivaient en vue de la détermination des CMB et CMF.

Le principe de l'expérimentation consiste à évaluer la plus faible concentration de l'HE où aucune sub-croissance microbienne n'est visible après subculture dans un milieu indemne d'HE à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24h pour les bactéries et $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 48h pour les levures.

Le protocole expérimental consiste à rendre liquide les milieux MH pour les bactéries et SAB pour les levures dans un bain Marie. Couler les boîtes de Pétri et

les laisser solidifier. Avec une pince stérile, on a prélevé aseptiquement les disques correspondant aux concentrations de l'HE où aucune croissance n'est observée pour chaque souche lors de la détermination des CMI.

On a replacé les disques dans les boîtes de Pétri déjà préparée. Puis incubées à $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 24h pour les bactéries et à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 48h pour les levures.

La lecture des milieux de culture s'était faite par estimation de la CMB et CMF. Elles ont été déterminées par le fait qu'il n'ya aucune sub-croissance de souches testées après sub-culture [98].

2.2.6. Préparation d'une pommade à usage topique

Une formule galénique topique adaptée aux HE d'*Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii* a été mise au point au niveau du laboratoire pharmacie galénique du CRD de SAIDAL [99].

2.2.6.1. Formulation de la pommade

Deux pommades à base d'HE d'origan et de thym ont été préparées en suivant les critères suivants:

2.2.6.1.1. Choix du principe actif (PA)

Le PA est représenté par les HE de l'origan et de thym. Ces HE seront utilisées dans la désinfection des plaies, ulcérations, les brûlures et diverses affections cutanées [100].

2.2.6.1.2. Choix de la pommade

L'action de la pommade est locale au niveau de la peau. La pénétration des principes actifs se fait plus ou moins en profondeur et peut s'infiltrer dans l'épaisseur de l'épiderme, jusqu'au derme, et à l'hypoderme et quelque fois au niveau des tissus sous-jacents [99].

2.2.6.1.3. Choix des excipients

Le choix des excipients a été justifié par des critères standardisés (nature physico-chimique des PA à véhiculer, bonne tolérance cutanée et surtout

habituellement utilisés en pommades). Les ingrédients employés lors des formulations des pommades sont consignés dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Excipients de la pommade à base d'HE d'*Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii* [101 et 102].

Nom	Synonyme/Dénomination INCI	Caractères	Point de fusion	Usages	Concentration moyenne
Lanoline	Graisse de laine, Lanoléine, lanoline anhydre, lanoline purifiée	Masse jaune, épaisse insoluble dans l'eau	40°C	Stabilise les émulsions H/L. Excipient pour pommades, pénétrant, émollit. Peut absorber par trituration jusqu'à deux fois son poids d'eau	10 à %20 (pommades, crèmes et laits)
Vaseline	Pétroléine, petrolatum, petrolum jelly, graisse de pétrole	Substance blanche, onctueuse, pâteuse, neutre et insoluble dans l'eau	40°C	Employée dans les pommades d'action superficielle, comme elle ne rancit pas, elle donne des pommades de bonne conservation	(10-30%(crèmes) Jusqu'à 100% pommades et onguents

INCI: International Nomenclature of Cosmetic Ingredients.

2.2.6.1.4. Préparation officinale et conditionnement de la pommade dermique

Nous avons préparé les pommades sur un modèle de base, qui provient du formulaire thérapeutique magistral [101, 103] (tableau 2.4).

Tableau 2.4 : Composition de la pommade dermique.

Dénomination INCI	Concentration (%)
Petrolatum	80-95
Lanoléine	5-20
HE d'origan et de thym	0,5 - 2 (qsp 100 et pH 6)

Le protocole classique de fabrication des pommades et le mode opératoire sont comme suivant :

- ❖ Nous avons pesé et incorporé de la lanoléine et du petrolatum dans un bécher en acier inoxydable avec bord et anse (selon BPF : Bonnes pratiques de fabrication des médicaments [104]).
- ❖ Le bécher a été porté au bain Marie à 60°C jusqu'à fusion complète des deux composés. Ces derniers sont mêlés sous une agitation mécanique avec un appareil type mélangeurs malaxeurs à mobilité planétaire et racloir muni d'une turbine (agitateur à hélice) (Appendice C₇).
- ❖ A température ambiante (25-30°C), nous avons ajouté l'HE d'Origan et de thym avec un compte goutte sous une homogénéisation continue (50 gouttes au gramme [101]).
- ❖ Les arômes et conservateurs des pommades étaient les HE, et la durée de conservation des pommades coïncidait avec celle des HE.
- ❖ Le conditionnement était réalisé dans des tubes aseptiques.

2.2.6.2. Contrôles physico-chimiques des pommades dermiques

Une diversité de contrôles a été indispensable pour définir les caractéristiques de la préparation topique obtenue selon des méthodes homologuées [101,104].

2.2.6.2.1. Contrôle des caractères organoleptiques

Les propriétés organoleptiques rassemblent tout ce qui perceptible par les sens : aspect, couleur, odeur et toucher. L'examen macroscopique implique également la recherche d'une opacité ou d'une texture particulière [105].

2.2.6.2.2. Contrôle de l'homogénéité

Une certaine quantité de pommade a été étalée sur une lame puis recouverte d'une lamelle pour l'observation microscopique. Ce examen permet d'apprécier l'homogénéité de la pommade [105].

2.2.6.2.3. Evaluation de la stabilité et vieillissement accéléré

Les principaux phénomènes d'instabilité ont été estimés dans une éprouvette graduée par l'observation à intervalles de temps réguliers. La coalescence des

gouttes ou le déphasage ont été étudiés par centrifugation à vitesse constante (900g pendant 30mn) [105].

2.2.6.2.4. Détermination du pH

La mesure du pH a été effectuée à l'aide d'une électrode plongée dans la pommade liquide avant refroidissement complète.

2.2.6.3. Contrôle de la qualité microbienne des pommades dermiques

Le but de ce contrôle est d'apporter les moyens de confirmer que la pommade dermique réponde aux exigences microbiologiques spécifiées dans les monographies de la pharmacopée européenne.

Le principe de la méthode est basé sur le dénombrement des germes viables totaux par la technique de dénombrement sur plaque de gélose et la recherche des germes spécifiés [106] (figure 2.10).

2.2.6.3.1. Dénombrement des germes viables totaux

Le dénombrement a été réalisé sur des germes viables mésophiles et champignons. La technique a été réalisée selon les étapes suivantes:

2.2.6.3.1.1. Protocole expérimental

La technique recommande des conditions d'asepsie rigoureuse d'où la stérilisation du laboratoire aux UV et les manipulations ont été effectuées sous une hotte à flux laminaire.

2.2.6.3.1.2. Préparation de l'échantillon

La préparation des dilutions (1/10) se fait par dissolution de 10 g ou 10 ml de produit à examiner dans 90 ml de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7, complétée de polysorbate 80 à une concentration de 1g/l.

2.2.6.3.1.3. Examen des échantillons par dénombrement sur plaque de gélose

La technique d'ensemencement en profondeur consiste à introduire 1ml de chaque diluant de l'échantillon dans au moins (02) boites de Pétri (9 cm de

diamètre) par milieu et par dilution, puis à rajouter 15ml à 20ml de milieu gélosé liquéfié aux peptones de caséine et de soja (TSA), adéquat à la culture des bactéries et un autre milieu gélosé liquéfié Sabouraud, conforme à la culture des moisissures et levures à une température ne dépassant pas 45°C.

L'incubation des boîtes de Pétri s'est faite à 37°C pour les bactéries, à 25°C pour les moisissures et levures pendant 05 jours.

2.2.6.3.1.4. Lecture

La sélection a été réalisée sur les boîtes correspondant à une dilution et exposant le plus grand nombre de colonies inférieur à 300 pour les bactéries et inférieur à 100 pour les levures et moisissures.

La moyenne arithmétique des dénombrements a été prise et nous avons calculé le nombre d'UFC (unité formant une colonie) par gramme ou par millilitre de produit.

2.2.6.3.2. Recherche des germes spécifiés

Dans l'objectif de rechercher les entérobactéries, autres bactéries Gram positifs et négatifs. Le suivi des étapes suivantes est indispensable (figure 2.10).

2.2.6.3.2.1. Recherche des entérobactéries et certaines autres bactéries Gram⁻

Le produit à étudier a été dilué à 1/10 dans un milieu nutritif (Bouillon lactosé) puis incubé à 37°C pendant 2 heures. Après agitation, nous avons prélevé 1 ml de son contenu et nous l'avons inoculé à 10 ml de milieu d'enrichissement Mossel, après une incubation à 37°C pendant 18 à 48h, des subcultures seront réalisés sur milieu gélosé d'isolement VRBG (gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre), ces dernières sont incubées à 37°C pendant 24h.

2.2.6.3.2.2. Recherche d'*Escherichia coli*

Nous avons préparé le produit à examiner par dilution de 10 g de pommade dans 90 ml solution tampon peptonée au chlorure de sodium à un pH 7 additionnée de polysorbate 80.

Nous avonsensemencé 90ml de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja avec 10 ml de l'échantillon, après homogénéisation nous incubons à 37°C pendant 18 - 48 h.

Nous avons transféré après agitation, 1 ml de son contenu pourensemencer 100 ml de milieu liquide de Mac Conkey, ensuite une incubation à 45°C pendant 18 - 24 h est nécessaire.

Des subcultures ont été réalisées sur milieu gélosé Mac Conkey et une incubation à 37°C pendant 18 à 72 h a été effectuée.

La croissance de colonies rouges, non mucoïdes, de bactéries Gram négatif en bâtonnets montre la présence possible d'*Escherichia coli* qui est certifiée par des examens biochimiques appropriés (production d'indole).

2.2.6.3.2.3. Recherche *Pseudomonas aeruginosa*

Nous avons préparé le produit à examiner par dilution de 10 g de pommade dans 90 ml de tampon pH 7, 10ml de cet échantillon estensemencé avec 90 ml de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja, après homogénéisation nous incubons à 37°C pendant 48 h.

Des subcultures ont été faites sur milieu gélosé Cétrimide ensuite incubation à 37°C pendant 72 h.

2.2.6.3.2.4. Recherche de *Stapylococcus aureus*

Nous avonsensemencé comme décrit précédemment 10 ml de l'échantillon (préparé dans tampon phosphate pH 7) avec 90ml de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja, après homogénéisation nous avons incubé à 37°C pendant 48 h ensuite des subcultures sont accomplies sur milieu gélosé Chapman et incubation à 37°C pendant 72 h.

La croissance de colonies jaune d'or de cocci Gram positif entourées d'une zone claire, confirme la présence de *Staphylococcus aureus*. Ce résultat est confirmé par des tests biochimiques adéquats.

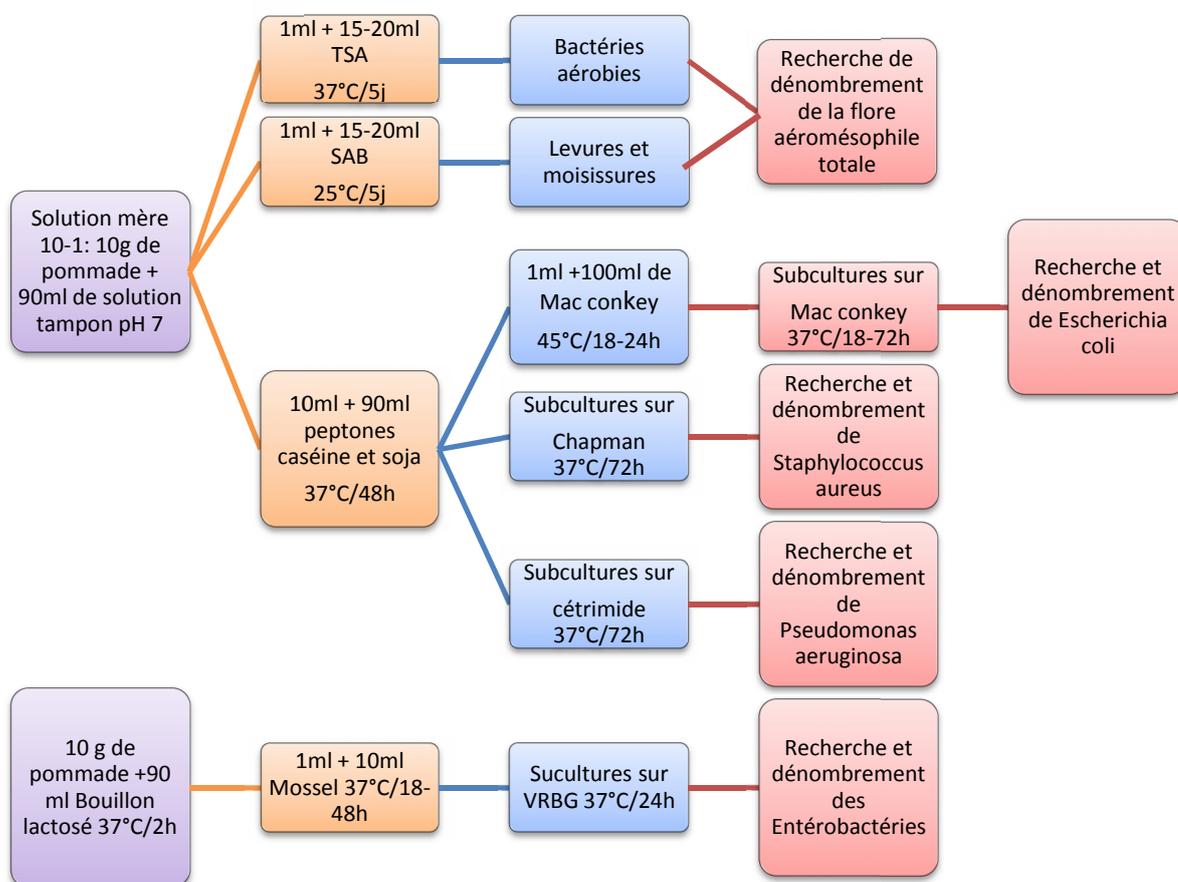


Figure 2.10 : Protocole d'analyse de la qualité microbienne des préparations pharmaceutiques (pommades dermiques) (Monographies de la pharmacopée [106]).

Lorsque, les tests biochimiques et sérologiques de confirmation sont négatifs, on dit que le produit analysé est conforme (absence de colonies types cités), [106].

2.2.7. Essais pharmaco-toxicologiques

Nous avons réalisé ces tests sur lapins et rats, pour montrer que les pommades ne sont pas irritantes aux concentrations préparées et qu'elles ont un effet cicatrisant en comparaison avec une pommade cicatrisante de référence qui est Madécasol®, avec l'emploi préconisé chez l'homme.

2.2.7.1. Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée (IPC)

Cette technique a été effectuée selon les étapes suivantes:

2.2.7.1.1. Principe

L'indice d'irritation primaire cutanée des pommades testées a été déterminé chez le lapin selon une méthode de référence [107].

Le dos de chaque animal est divisé en deux zones après rasage. Sur l'une des zones scarifiée, le produit est étalé, en contact avec la peau avec un pansement pendant 24 heures. Des lectures sont accomplies en 24 h et 72 h après l'emploi des pommades.

L'autre zone rasée et scarifiée est prise comme témoin. Elle est laissée à l'air libre.

Les lectures consistent à évaluer l'érythème et l'œdème selon une échelle numérique notée de 0 à 4.

L'estimation de l'indice d'irritation primaire cutanée IP se fait par l'additionnement des chiffres obtenus pour l'érythème et l'œdème à chaque temps de lecture (24 et 72 heures après l'application) et pour chacune des zones. Les chiffres ainsi obtenus sont ajoutés, la somme totale est divisée par 24, la moyenne ainsi obtenue représente l'IP.

2.2.7.1.2. Protocole expérimental

Nous avons tondu soigneusement les flancs de 3 lapins mâles et 3 femelles Néozélandaises albinos (2,5 - 3 kg) la veille de l'application (Figure 2.11), un flanc a servi de témoin, les deux flancs ont été scarifiés par 3 incisions parallèles de 3 cm de long, espacées de 0,5 cm à l'aide d'un scalpel. Vingt-quatre heures plus tard, une quantité de 0,5 g de pommades contrôlées ont été appliquées (pommade à 1% d'HE de l'origan et 1% d'HE de thym préparées) sur le flanc essai.



Figure 2.11 : Flanc de lapin rasé (originale, 2014).

2.2.7.1.3 Lecture

La lecture a été faite 24 h plus tard puis 72 h après l'application, l'estimation de l'IPC s'est portée sur la formation de l'érythème et l'œdème qui sont notés suivant l'échelle numérique (Tableau 2.5).

L'évaluation de l'indice d'irritation primaire cutanée s'est faite par la formule suivante :

$$IPC = \frac{\text{Somme des valeurs de l'érythème et de l'œdème}}{24}$$
 (24 = nombre de lapins (6) x nombre de zones testées (traité et témoin = 2) x nombre de type d'irritation (œdème et érythème = 2).

Selon la gravité des réactions observées, les produits sont classés en: non irritants ($IPC < 0,5$), légèrement irritants ($0,5 < IPC < 2$), irritants ($2 < IPC < 5$) et sévèrement irritants ($5 < IPC < 8$) [107].

Tableau 2.5 : Estimation de la tolérance cutanée in vivo [107].

Echelle	Erythème et formation d'escarres	Evaluation de l'œdème
0	Pas d'érythème	Pas d'œdème
1	Léger érythème (à peine visible)	Œdème très léger (à peine visible)
2	Erythème bien visible	Léger œdème (contours bien définis, gonflement apparents)
3	Erythème modéré à important	Œdème moyen (épaisseur 1mm)
4	Erythème grave (rouge pourpre) avec ou sans escarres	Œdème grave (épaisseur > 1mm)

2.2.7.2. Etude de la cicatrisation de plaies in vivo des pommades dermiques

2.2.7.2.1. But et principe

Nous avons choisi de caractériser l'activité cicatrisante en accomplissant des tests spécifiques plus adaptés à l'évaluation du processus. Pour cela nous avons réalisé in vivo chez des rats Whistar Albinos une expérimentation aboutissant à la création artificielle de blessures plus ou moins importantes permettant ainsi une appréciation plus complète des paramètres retenus et ceci par application des pommades à base d'HE (0,5 et 1%) d'*Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii*, la lecture des résultats a été réalisée en comparaison avec :

- Un groupe percevant un produit de référence (Asiaticoside 1% principe actif du Madécassol®), sous forme d'onguent.
- Un groupe traité par l'excipient exempt de principe actif.
- Et un groupe ne percevant aucun traitement (lot placebo).

2.2.7.2.2. Méthodologie

Nous avons utilisé pour cette expérience 5 lots de 5 rats Whistar mâles et femelles de 200 g environ selon le procédé préconisée par Pourrat et *al.*, [108], deux plaies symétriques de 5 mm de diamètre sont effectuées de part et d'autre de l'axe vertébral de l'animal en utilisant une poinçonneuse à main, après avoir antérieurement rasés les deux flancs (Figure 2.12 et 2.13), sans avoir manqué d'anesthésier et calmer les animaux avec de la kétamine + Acépromazine en dose 2 ml / kg, dans notre cas on a administré respectivement 0,5 ml + 0,2 ml par voie intramusculaire aseptiquement (Appendice C₉).



a



b



Figure 2.13 : cicatrice symétrique
et circulaire (5mm)

Original, 2014

- ✓ 1^{er} lot : la plaie gauche ne reçoit aucun traitement alors que sur la plaie droite est appliqué l'excipient (E).
- ✓ 2^{ème} lot : la plaie gauche reçoit la substance de référence *Centelle asiatica* (Madécassol® 1%), alors que la plaie droite est traitée avec la pommade aux HE d'origan 0,5%.
- ✓ 3^{ème} lot : la plaie gauche reçoit la substance de référence, alors que la plaie droite est traitée avec la pommade aux HE d'origan à 1%.
- ✓ 4^{ème} lot: la plaie gauche reçoit le produit de référence, alors que la plaie droite est traitée avec la pommade aux HE de thym à 0,5%.
- ✓ 5^{ème} lot: la plaie gauche reçoit le produit de référence, alors que la plaie droite est traité avec la pommade aux HE de thym à 1%.

Les produits ont été appliqués quotidiennement pendant 14 jours et l'observation macroscopique a été effectuée avant chaque nouvelle application dans des exigences expérimentales précises, à l'aide d'une loupe au grossissement x 6 avec éclairage artificiel en immobilisant l'animal sur la paille (appendice C₁₀).

Chaque animal était placé dans une cage individuelle. Il recevait de la nourriture granulée et de l'eau (appendice E) durant tout le traitement jusqu'à la cicatrisation totale.

Cinq paramètres ont été retenus pour apprécier le déroulement du processus de cicatrisation. Il s'agit de :

- La surface de la plaie.
- La profondeur de la plaie.
- L'apparition ou non d'un œdème.
- L'apparition ou non d'un bourgeon.
- L'épaisseur de la croûte et son renouvellement.

Pour les quatre derniers paramètres, nous avons pris une échelle de cotation (0 à 4) [108], afin de suivre l'évolution du processus de cicatrisation (tableau 2.6).

Tableau 2.6 : Suivi du processus de cicatrisation.

Echelle de cotation Pourrat	Profondeur	Bourgeon	Œdème	Epaisseur de la croûte
0	Nulle	Absence de bourgeon	Pas d'œdème	Inexistante
1	Légèrement creusée	Petit bourgeon	Très léger œdème	Début de formation
2	Peu profonde	Gros bourgeon central	Œdème visible	En voie d'épaississement
3	Assez profonde	Bourgeonnement massif	Œdème moyen	Epaisse
4	Très profonde	Bourgeonnement excessif	Œdème grave	Très épaisse, granuleuse et bombée

Quand à la surface de la plaie, elle est exprimée en mm², mesurée à l'aide d'un compas à partir du diamètre mesuré perpendiculairement à l'axe vertébrale [108].

2.2.8. Analyse statistique

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne, antioxydante d'HE et activité cicatrisante des pommades à base d'HE d'*Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii* ont été soumis à une analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA 2), avec un niveau de signification de 0,05 en utilisant le logiciel statistique IBM SPSS 24.0.

Tous les graphes et les histogrammes obtenus ont été réalisés en utilisant le logiciel: Excel (Microsoft Office 2007).

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Etude botanique d'*Origanum floribundum* Munby

Des observations macroscopique et microscopique ont été réalisées pour décrire les organes de la plante.

3.1.1 Etude macroscopique de la fleur

Les fleurs de l'origan sont assemblées en panicule (corymbe) au sommet de la tige et des rameaux (figure 3.1 a et b). Elles sont entourées de bractées ovales vertes à rouges violettes, avec un pédoncule de couleur rouge.

La fleur est hermaphrodite et actinomorphe. Elle est de petite taille de $2,22 \pm 0,7$ mm de longueur et $1,00 \pm 0,00$ mm de largeur. Elle dispose de pétales de couleur rose et au nombre de 5. Elles sont plus longues que les sépales, présentant des extrémités arrondies (figure 3.2 a).

Nous avons noté la présence de vésicules de couleur jaune or. Ce sont les poils sécréteurs d'HE (trichomes) et tecteurs qu'on trouve également au niveau des sépales et recouvrant tout le calice, bractées et pédoncule. Les sépales sont dressés en 5 dents pointues et courtes (figure 3.2 a, b et c).

Le nombre d'étamines est de 4 disposées sur deux verticilles. Les étamines inférieures sont un peu plus longues. Nous avons remarqué aussi la présence de trichomes mais une absence totale de poils tecteurs (figures 3.3 a, b et c et 3.4).

L'ovaire est supère, le carpelle a également un style, un seul stigmate et de trichomes avec absence de poils tecteurs (figure 3.5). Le fruit sec libère 4 akènes de couleur marron foncé et qui sont tapissés de trichomes et poils tecteurs. La longueur de l'akène est de $1,49 \pm 0,51$ mm et $0,5 \pm 0,20$ mm de largeur (figure 3.6 a, b et c). Les travaux botaniques réalisés sur l'espèce origan du bassin méditerranéen, ont montré que les trichomes sont présents au niveau des organes végétatifs, mais leur nombre diminue au niveau des organes reproductifs et sont absents au niveau des étamines et carpelles [109,110].

Notre étude a révélé la présence des trichomes glandulaires sur tous les organes, mais surtout sur feuilles et les fleurs. L'existence des sites sécréteurs d'HE d'*Origanum floribundum* sur carpelle et étamine est bien évident par observation à la loupe (Figure 3.4 et 3.5).

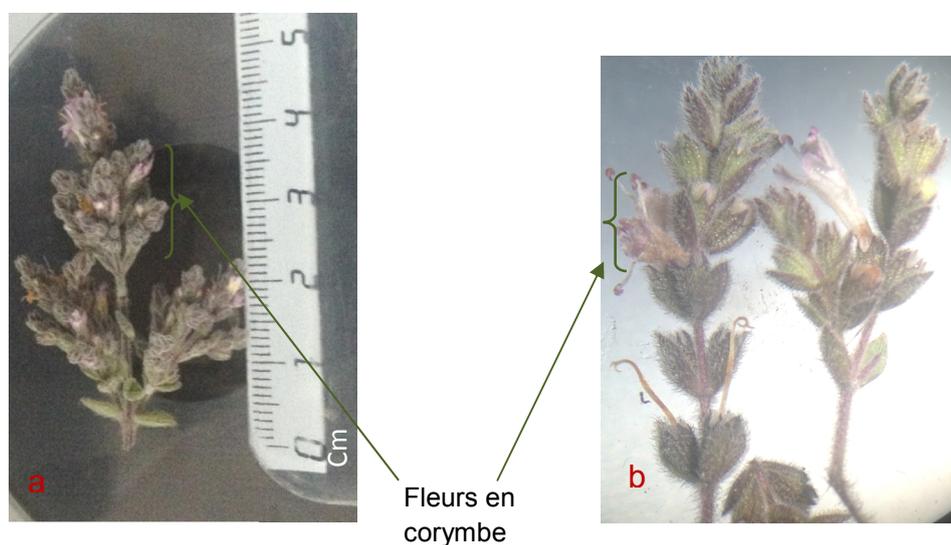


Figure 3.1 : Inflorescences en épis, en vue générale réunis en corymbe d'origan a et b (Gr x 0,8 x 10) (à la loupe)

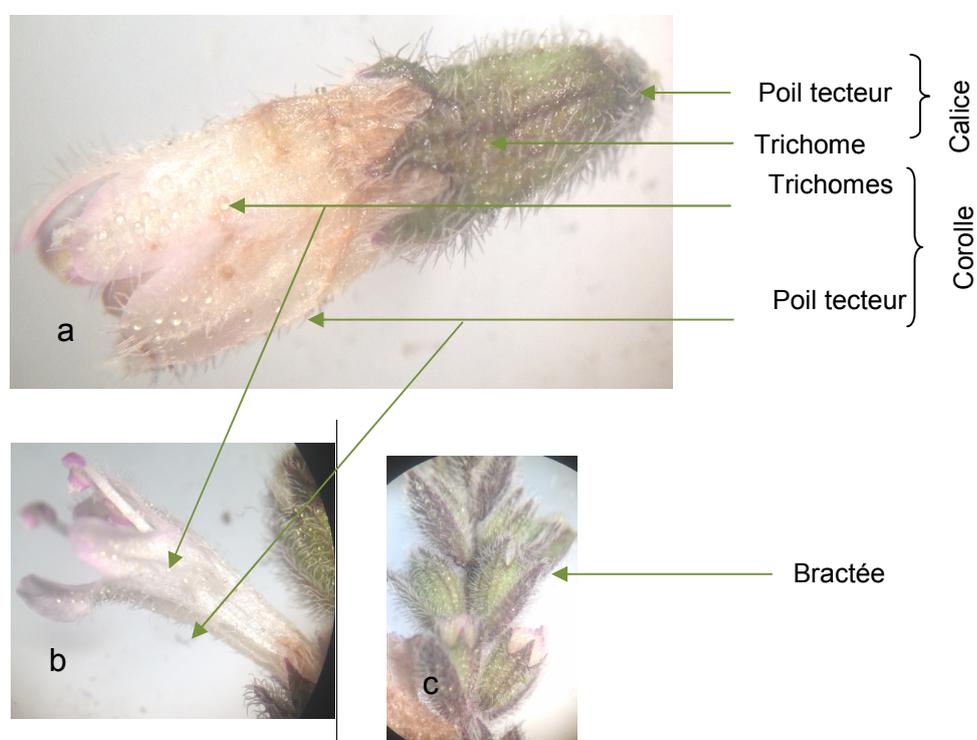


Figure 3.2 : Présence des trichomes et poils tecteurs au niveau du périanthe (a, (Gr x 3 x 10), (b et c) (Gr x 2,5 x 10)) (à la loupe)

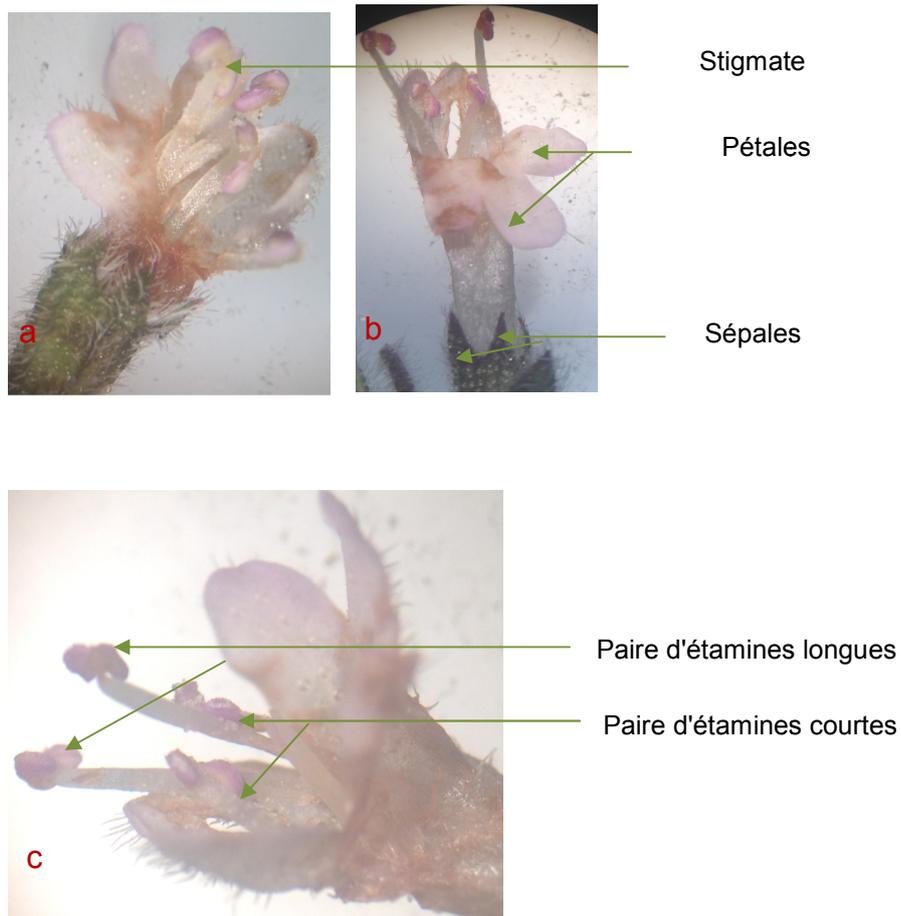


Figure 3.3 : Disposition des étamines et carpelle dans la corolle
(Gr x 2,5 x 10) (a et b) et (Gr x 3 x 10) (c) (à la loupe)

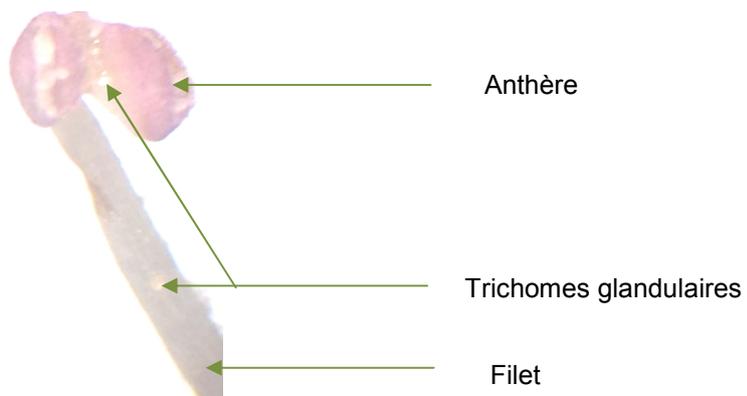


Figure 3.4 : Etamine, (Gr x 4 x 10) (à la loupe)

(originale 2014)

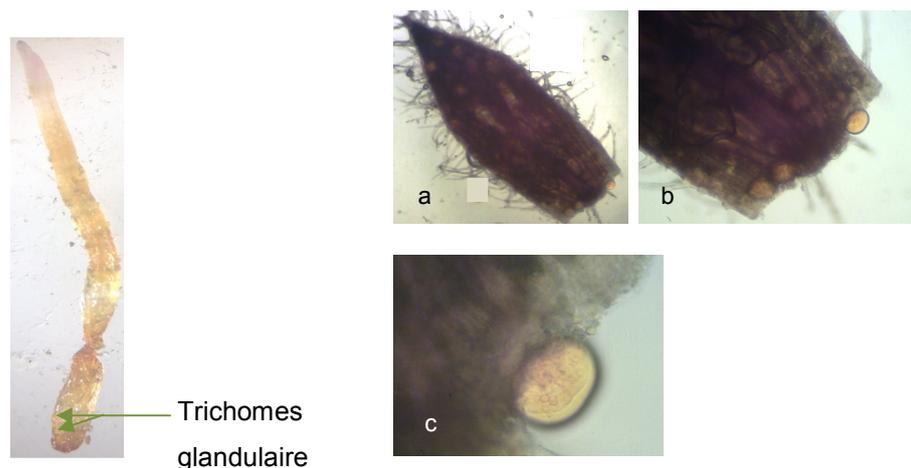


Figure 3.5 : Présence de trichomes au niveau du carpelle observés à la loupe, (Gr x 4 x10)

Figure 3.6 : Akène tapissé de poils tecteurs et trichomes glandulaires, (Gr x (4, 10 et 40) x10 (a, b et c) (à la loupe)

3.1.2. Etude macroscopique de la feuille d'origan

La feuille est lancéolée, pointue et pétiolée de $16,34 \pm 2,54$ mm de longueur et $15,00 \pm 2,54$ mm de largeur. Elle est tapissée de poils tecteurs et trichomes plus abondants sur la face inférieure (figure 3.8 A, B et C) que la face supérieure (figure 3.7 A, B et C).

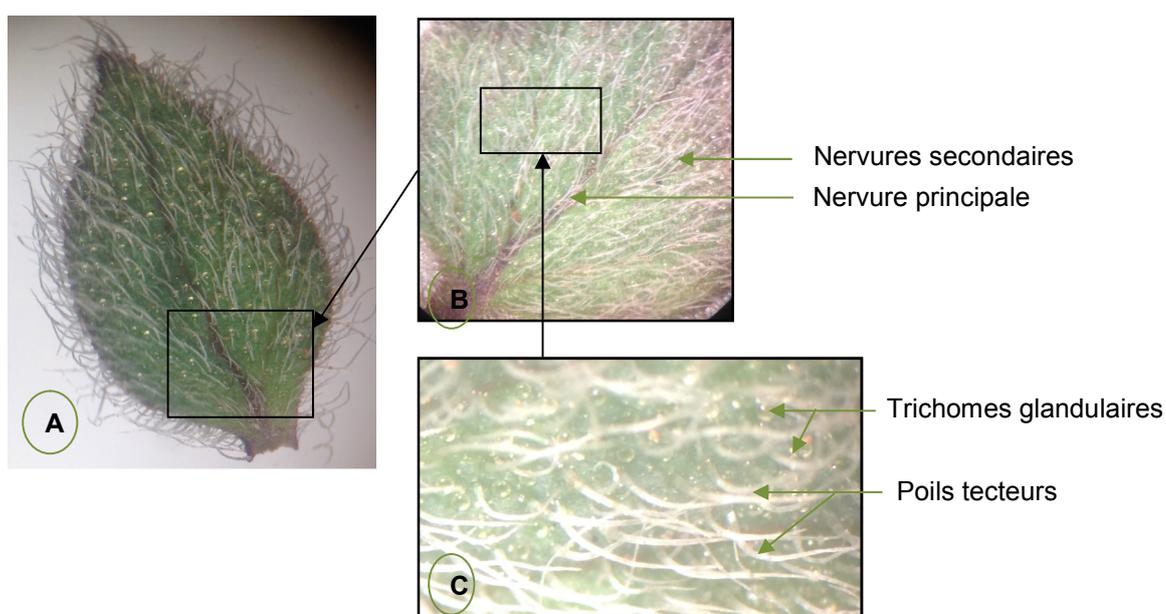


Figure 3.7 : Présence des trichomes et poils tecteurs sur la face supérieure de la feuille (Gr x 0,8 x10 (A), Gr x 2,5 x 10 (B) et 3 x 10 (C)) (à la loupe)

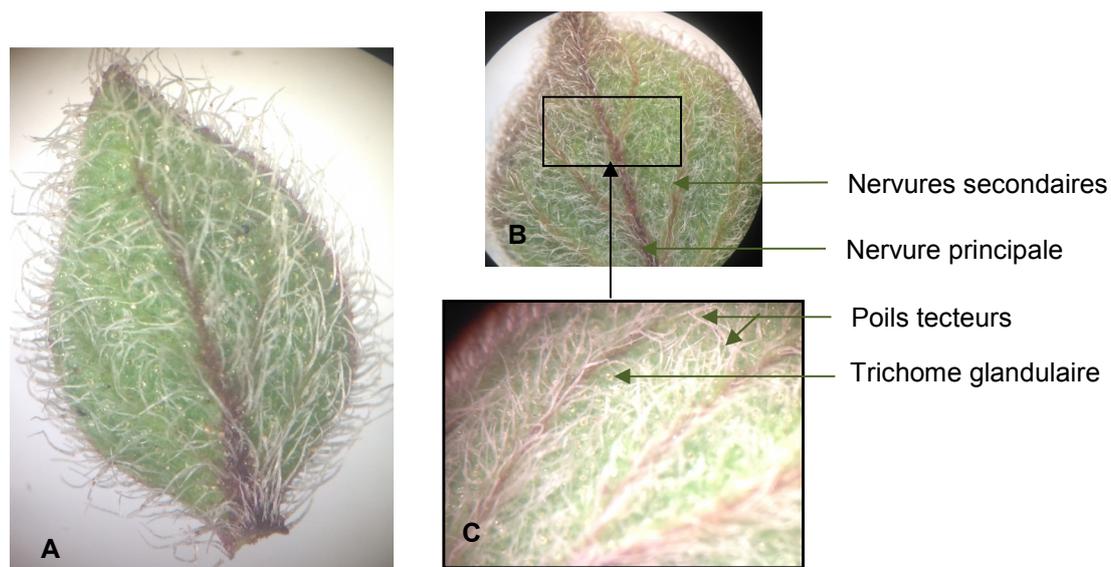


Figure 3.8 : Présence des trichomes et poils sécréteurs sur la face inférieure de la feuille observés à la loupe (Gr x 0,8 x 10 (A), Gr x 2,5 x 10 (B) et Gr x 3 x 10 (C))

3.1.3. Etude macroscopique de la tige

La tige de couleur rougeâtre est semi- ligneuse au niveau de la base, de $57,36 \pm 7,14$ cm de longueur et devient herbacée vers la sommité (3.9 A et B). Sous la loupe, nous avons noté la présence d'un tapis de poils tecteurs et de certains trichomes (figure 3.9 C et D).



Figure 3.9 : Présence de poils tecteurs et peu de trichomes sur la tige (taille réelle A et B), puis à la loupe Gr x 0,8 x 10 (C) et Gr x 2,5 x 10 (D)

(originale, 2014)

3.1.4. Etude microscopique de la tige

La forme de la coupe est de section carrée très habituelle chez les Lamiacées [82]. Les coupes transversales de la tige à main levée et au microtome, présentent les tissus suivants de la périphérie vers le centre (figures 3.10, 3.12 et 3.13) :

- Épiderme

est un tissu périphérique est constitué d'une ou deux couches de cellules alignées en fil radial. Nous avons remarqué la présence de nombreux poils tecteurs pluricellulaires et quelques trichomes contenant de l'HE (figure 3.11).

- Le parenchyme cortical

présente cinq à six assises de cellules plus ou moins arrondies. Quand au collenchyme, il est composé de cellules épaisses pecto-cellulosique occupant chaque coin et se prolonge souvent en une seule couche sous-épidermique (figure 3.13).

- Cylindre centrale

Il est disposé d'un tissu de soutien dont les cellules sont mortes, les fibres de sclérenchyme qui entourent complètement les tissus conducteurs. Ces derniers sont constitués d'un anneau de deux ou trois assises de cellules, montrent des parois lignifiées.

- Vaisseaux conducteurs

Le phloème est un tissu vivant qui conduit la sève élaborée. Il est disposé en bande continue vers l'extérieur appelé Liber et est formé de petites cellules arrondies vivantes, dont les parois sont pecto-cellulosiques.

Le xylème, tissu mort conduit la sève brute. Nous le reconnaissons sur les coupes réalisées vers l'intérieur, représenté par le bois hétéroxylé. Il est composé de cellules dont les parois présentent un épaissement ligneux (figure 3.13) .

La moelle

Elle est considérable, est constituée de parenchyme de stockage appelé parenchyme médullaire (figure 3.10 et 3.12).

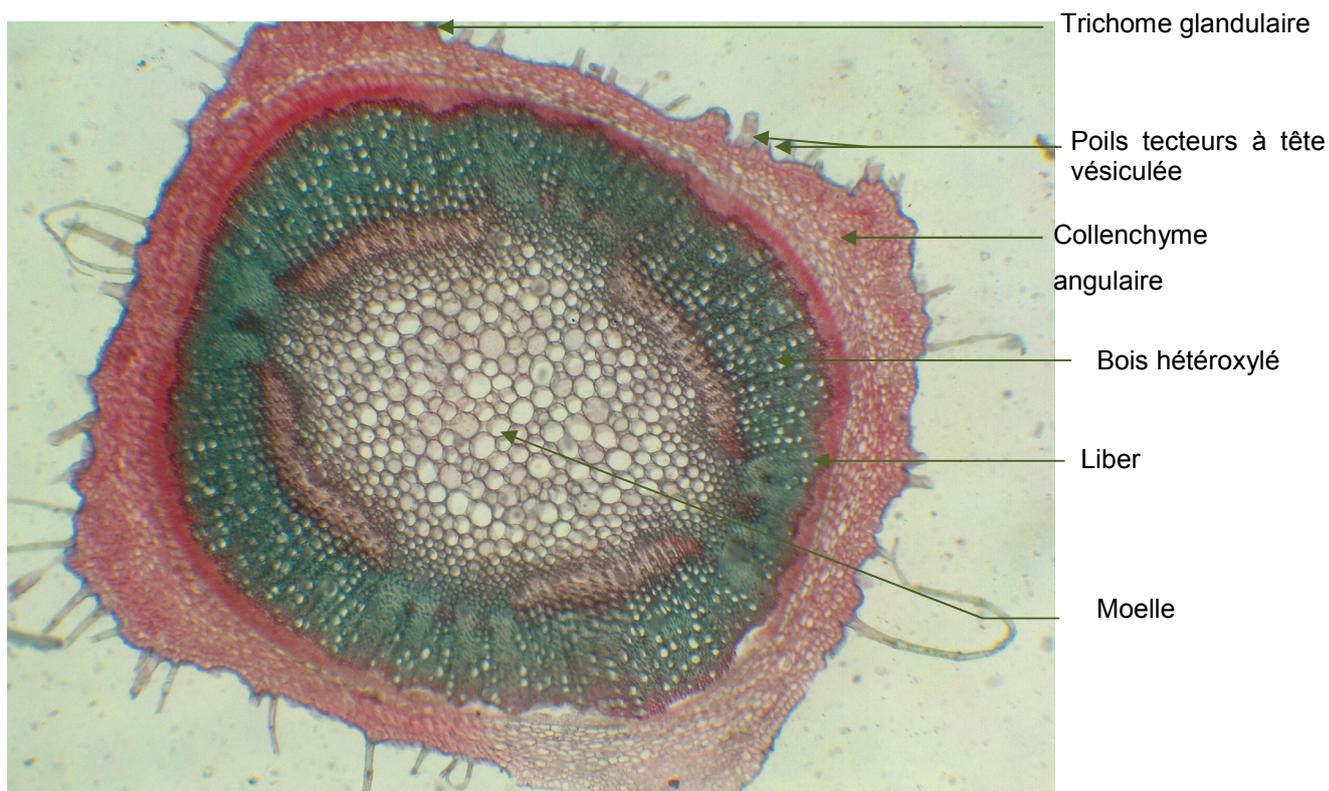


Figure 3.10 : Coupe transversale en vue générale de la tige d'*Origanum floribundum* (Gr x 4 x 10) à main levée, après double coloration (au microscope)

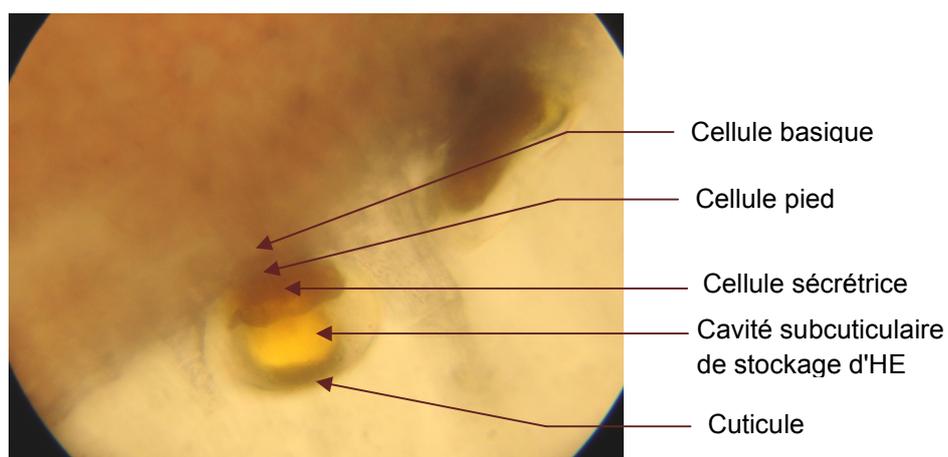


Figure 3.11 : Coupe transversale d'une partie de la tige d'*Origanum floribundum* montrant deux trichomes glandulaires (Gr x 40 x 10) à main levée, après double coloration (originale, 2014)

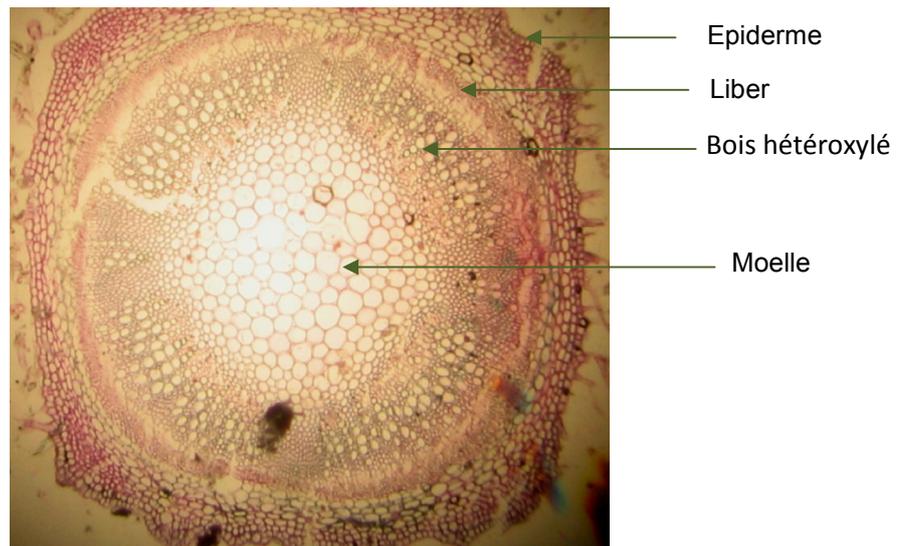


Figure 3.12 : Coupe transversale d'une vue générale de la tige d'*Origanum floribundum* au microtome (Gr x 10 x10) (au microscope)

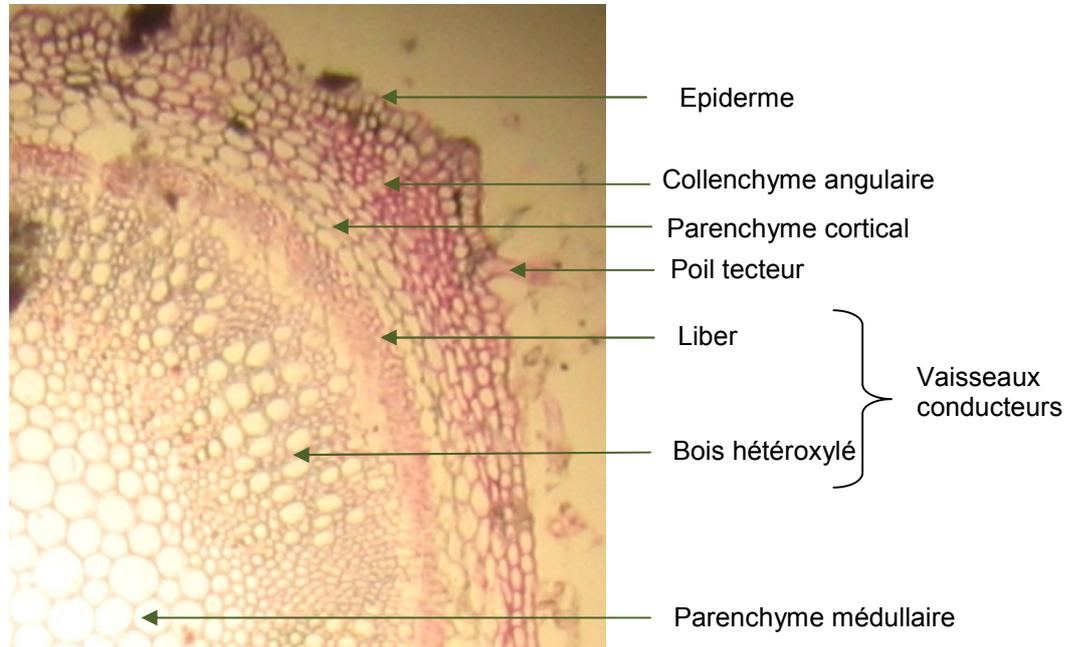


Figure 3.13 : Coupe transversale d'une portion de la tige au microtome (Gr x 40 x 10) (au microscope)

(originale, 2014)

3.1.5. Etude microscopique de la feuille d'origan

Les coupes transversales à main levée et au microscope confirment que la feuille est un organe aplati avec une symétrie bilatérale. La nervure principale abrite les vaisseaux conducteurs (figure 3.14 a et b).

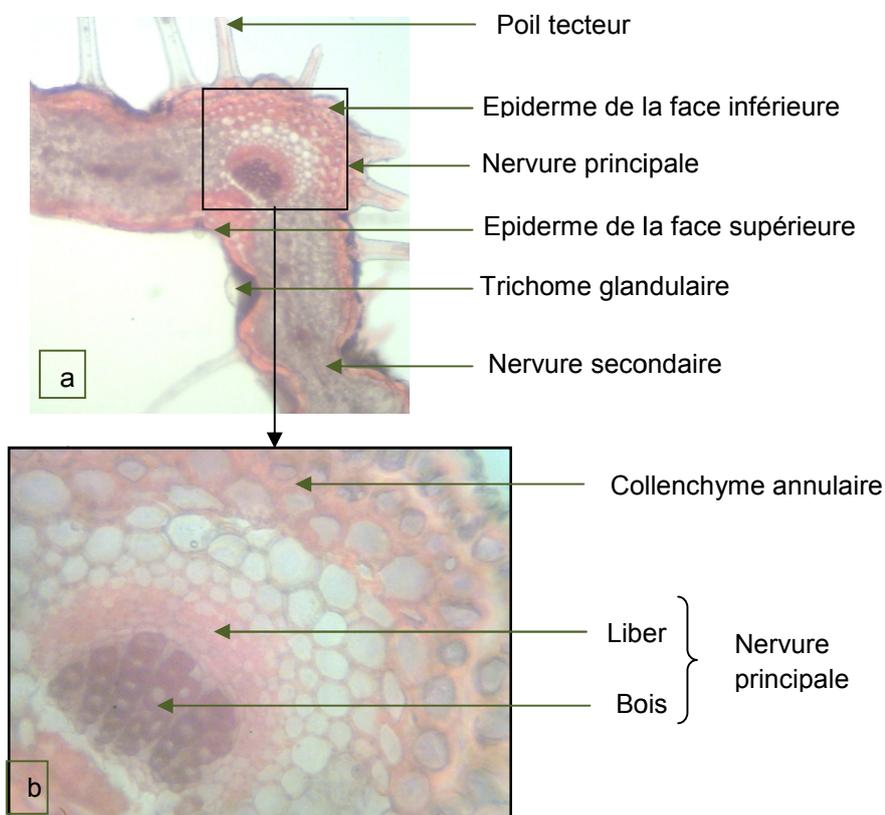


Figure 3.14 : Coupe transversale de la nervure principale d'*Origanum floribundum* à main levée, (Gr x 10 x 10 (a) et x 40 x 10 (b)) (au microscope)

(originale, 2014)

Les épidermes supérieur et inférieur sont formés par une assise de cellules épidermiques, recouverte d'une cuticule vers l'extérieur. Certaines de ces cellules épidermiques s'allongent vers l'extérieur pour donner des poils tecteurs et des trichomes glandulaires.

De l'extérieur vers l'intérieur, nous retrouvons:

- Le parenchyme palissadique formé de cellules allongées (figure 3.17), agencées les unes contre les autres.

- Le parenchyme lacuneux vers l'intérieur, il est formé de cellules arrondies et courtes. Ces cellules laissent des lacunes entre elles (figure 3.17).

Au niveau de la nervure principale, nous retrouvons les vaisseaux conducteurs formés de liber et bois hétéroxylé (figure 3.14 b).

Les coupes transversales à main levée dans les feuilles d'origan nous a révélé la présence de trois types de trichomes glandulaires au niveau de l'épiderme. Il s'agit de trichome glandulaire en forme de rosace, en boule et avec pédoncule (figure 3.15). On note aussi la présence de nombreux poils tecteurs de deux formes unicellulaires et pluricellulaires (figure 3.16).

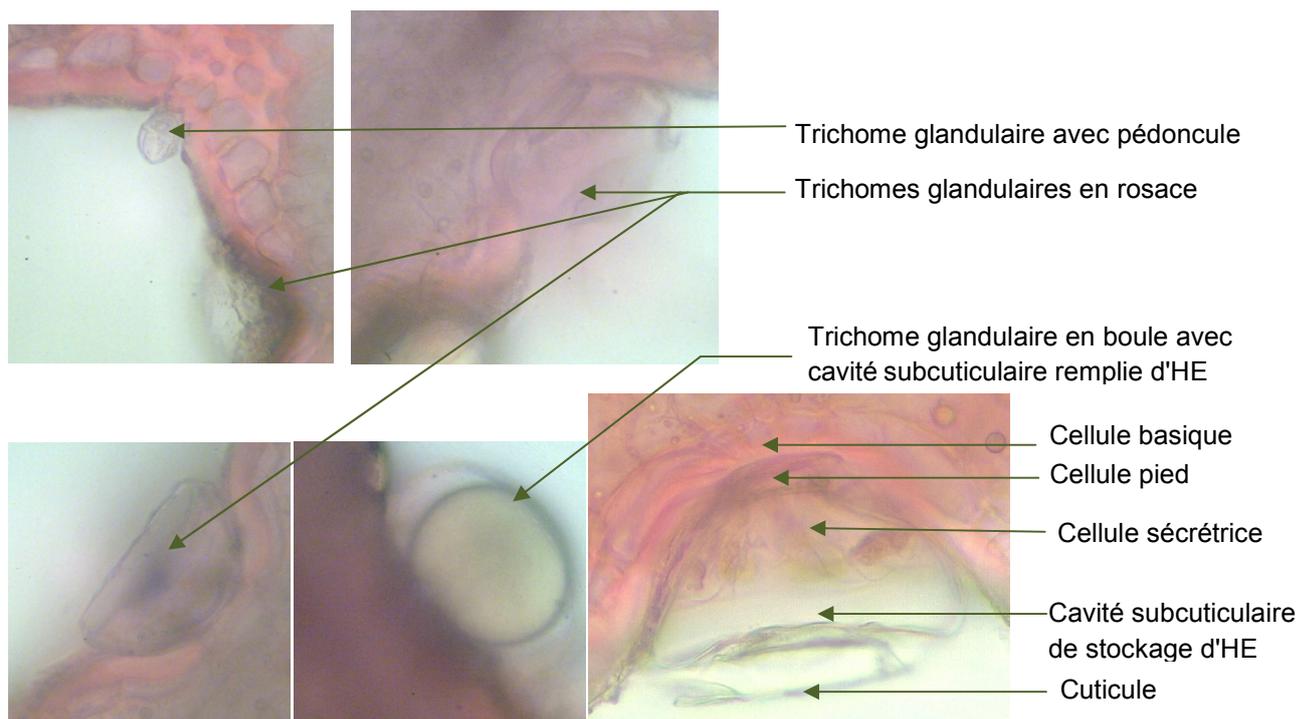


Figure 3.15 : Coupe transversale d'une partie de la feuille d'*Origanum floribundum*

à main levée montrant différents types de trichomes glandulaires (G x 40 x 10)

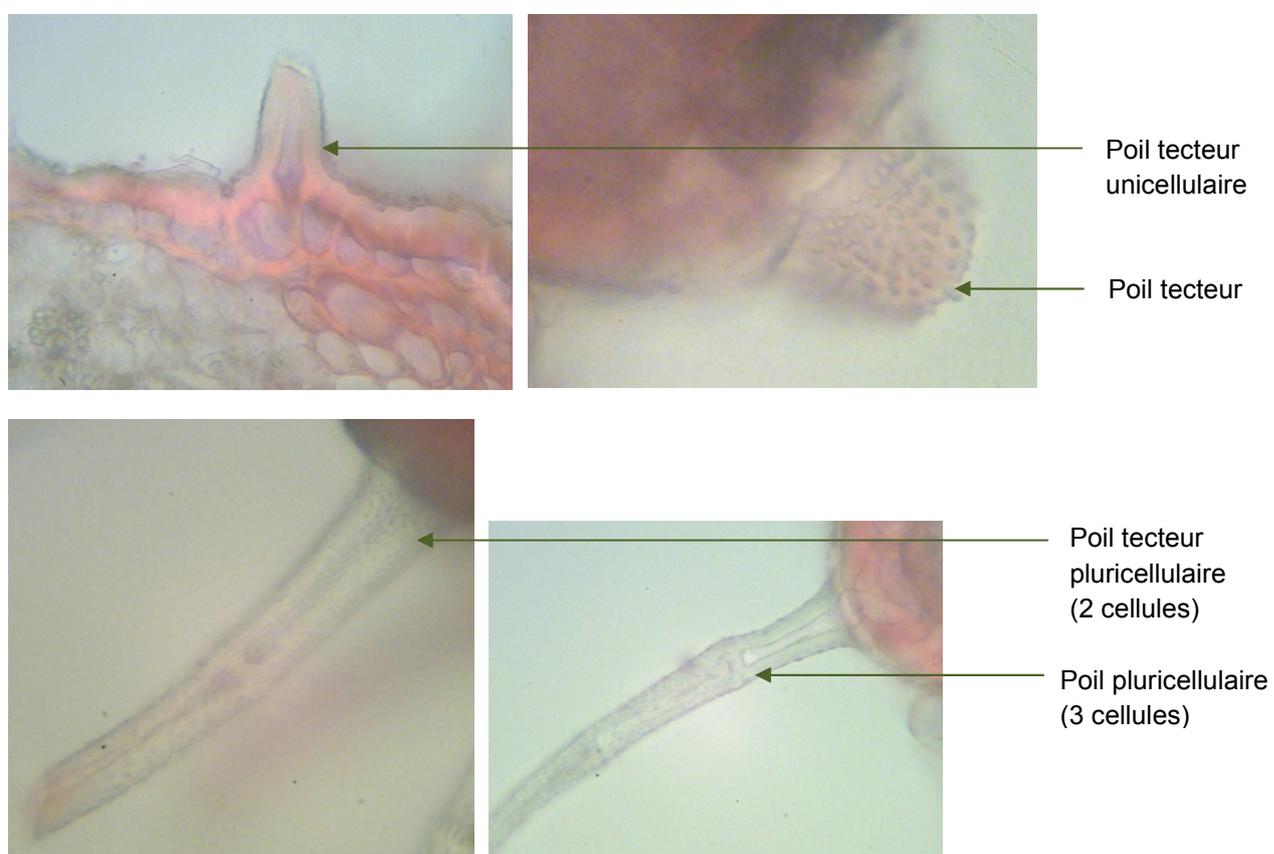


Figure 3.16 : Coupe transversale d'une partie de la feuille d'origan

Gr x 40 x 10, montrant différents poils tecteurs (au microscope)

(originale, 2014)

Les coupes au microtome nous ont permis d'observer de manière précise les tissus de la plante difficile avec des coupes à main levée car la plante est ligneuse, suite à des déchirures tissulaires observer fréquentes. (Figure 3.17, 3.18).

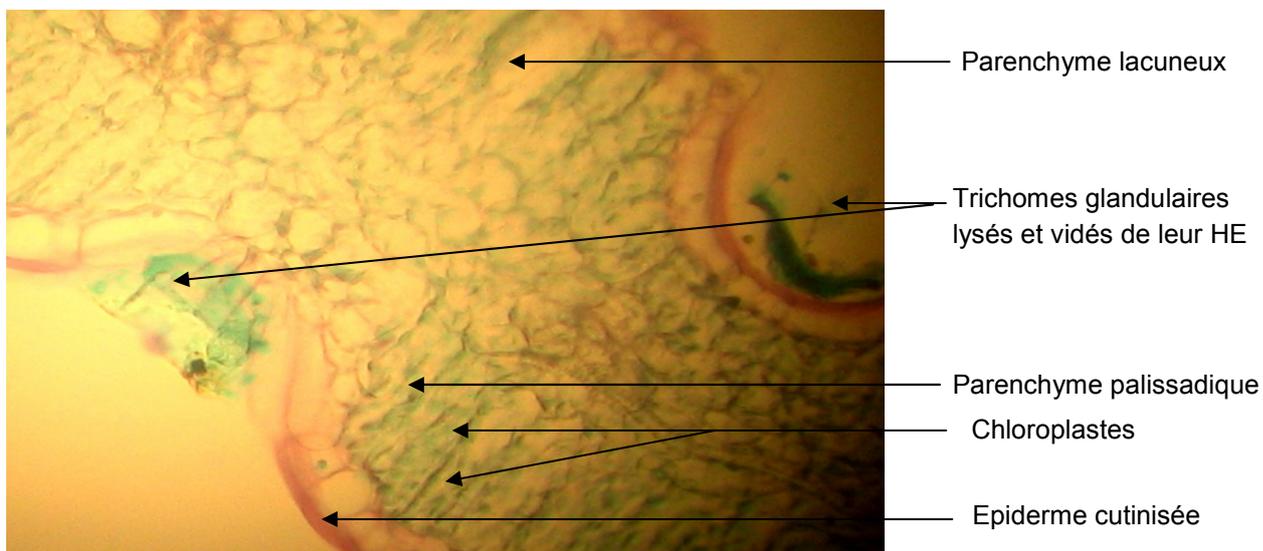


Figure 3.17 : Coupe transversale d'une feuille d'*Origanum floribundum* (Gr x 40 x 10)

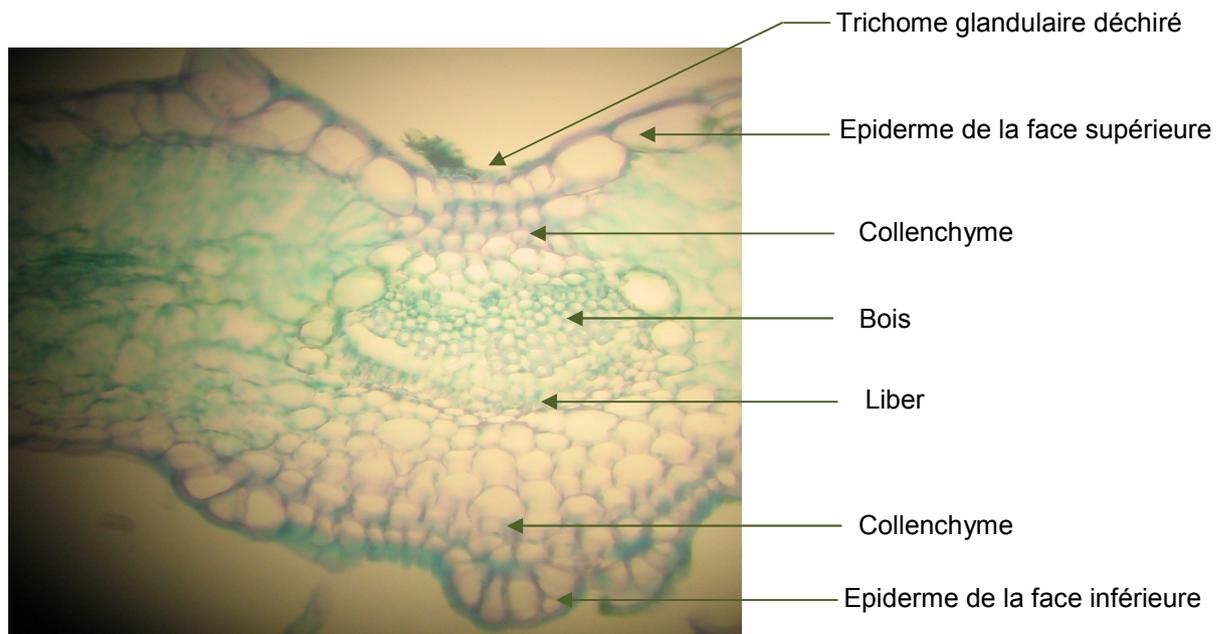


Figure 3.18 : Coupe transversale : au niveau de la nervure principale (Gr x 40 x 10)

(originale, 2014)

Le problème sur les coupes au microtome est que ces dernières perdent complètement l'HE des trichomes glandulaires. Nous ne retrouvons plus de trichomes au niveau des tiges, comparés aux coupes réalisées à main levée. Cette perte est sûrement due au trempage des coupes dans des bains de solvants et alcools qui rendent les tissus externes fragiles et les HE solubles.

Les coupes au microtome, nous ont permis de mettre en évidence l'aspect des trichomes glandulaires au niveau des feuilles. Le trichome est en forme de rosette. Cette description est citée dans plusieurs travaux de chercheurs [34, 111] (figure 3.19).

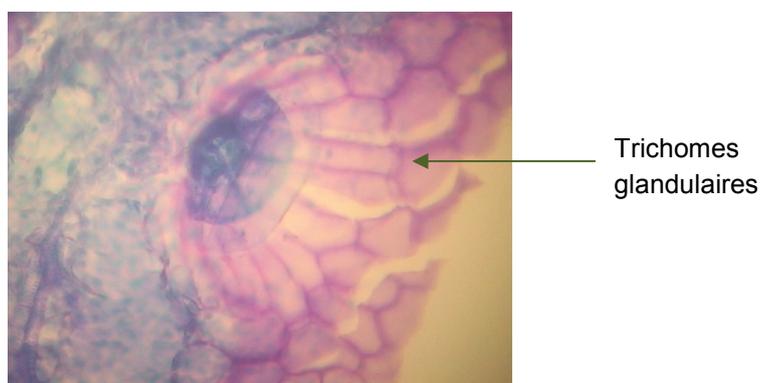


Figure 3.19 : Coupe transversale d'une partie de la feuille d'origan au microtome montrant un trichome glandulaire en forme de rosette Gr x 40 x 10

(originale, 2014)

Notre étude macroscopique et microscopique nous a confirmé que les sites sécréteurs d'HE se trouvent au niveau des trichomes glandulaires. Ils sont présents en surface des épidermes des organes végétatifs et reproducteurs.

Nous avons remarqué que leur abondance est plus marquée sur les feuilles et les fleurs. Ces résultats concordent avec les travaux de Werker et Ravid [109].

3.2. Etude botanique du thym

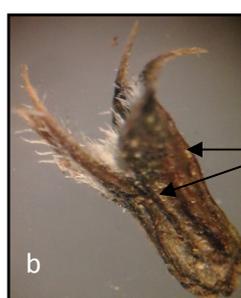
Nous avons effectué des observations macro et microscopique

3.2.1. Etude macroscopique de la fleur

Les fleurs sont blanches, petites ($5,6 \pm 0,49$ mm de long et $1,00 \pm 0,00$ mm de large), peu ciliées. Elles sont réunies en glomérules ovoïdes, pauciflores, l'ensemble constitue des grappes terminales lâches et feuillées, en épi court ($1,6 \pm 0,38$ cm) (Figures 3.20, 3.22). Elles sont zygomorphes et hermaphrodites.



Figure 3.20: Inflorescence du thym



Trichomes

Figure 3.21: Calice à tube ventru (à la loupe)
(a (Gr x 0,8 x 10) et b (Gr x 2,5 x 10)
(originale, 2014)

Le calice est glanduleux poilu, porté par une bractée en forme de feuilles en grappes axillaires lâches. Il est en forme de tube ventru à la base et de $3,5 \pm 0,39$ mm de long. Il est composé de 5 sépales soudés en deux lèvres inégales, celle du haut étant tridentée et celle du bas bilobée ciliée et arquée (Figures 3.21). La corolle blanche, légèrement ciliée, avec des glandes rougeâtres, ce qui la différencie de toutes les autres espèces [33] (figures 3.22 et 3.23). Les étamines sont en nombre 4, droites, saillantes, écartées, discrètement divergentes, presque égales ou les inférieures plus longues (figure 3.23 et 3.24).

Les carpelles sont lisses comportant quelques trichomes glandulaires (figure 2.25). Le fruit se compose de quatre akènes ovoïdes arrondis. A maturité ils donnent quatre minuscules graines de $1\text{mm}\pm 0,00$, de couleur brun foncé.

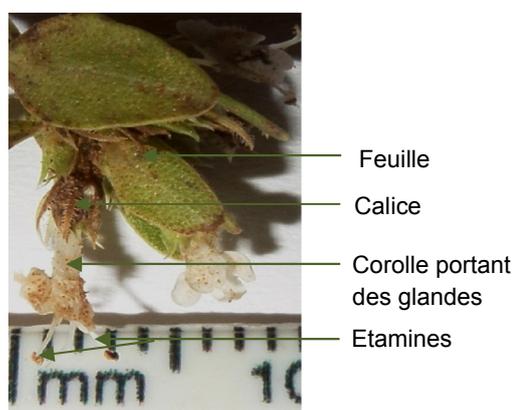


Figure 3.22: Sommités fleuries du thym
(Gr x 0,8 x 10) (à la loupe)

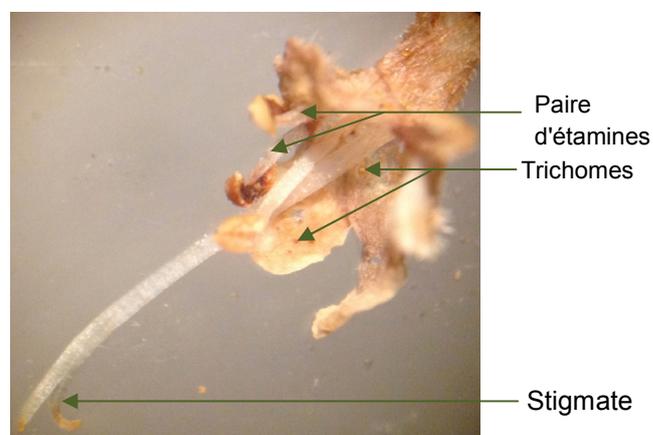


Figure 3.23: Arrangement des étamines et
carpelle dans la corolle (Gr x 2,5 x 10) (à la loupe)

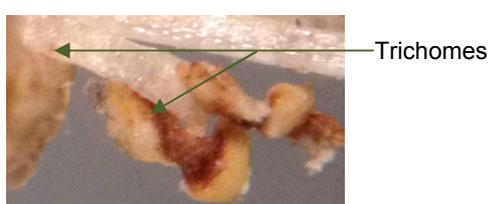


Figure 3.24: Présence
de trichomes sur l'étamine
(Gr x 4 x 10) (à la loupe)

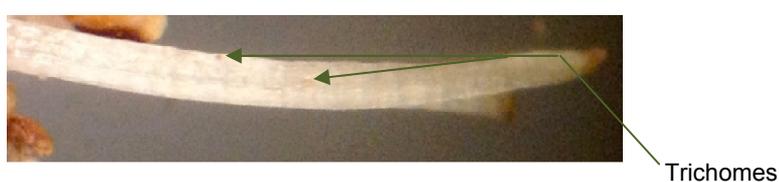


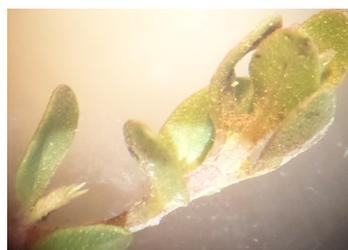
Figure 3.25: Carpelle comportant des trichomes
glandulaires (Gr x 4 x 10) (à la loupe)
(originale, 2014)

3.2.2. Etude macroscopique de la feuille du thym

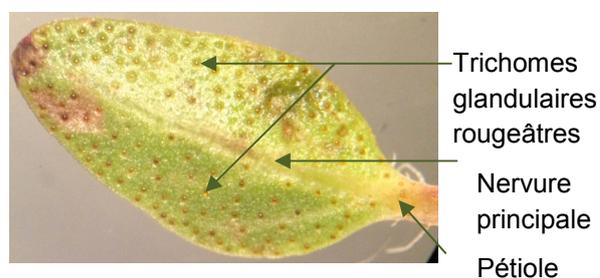
Les feuilles sont petites, opposées, courtement pétiolées de $6,1\pm 2,16\text{mm}$ de long sur $2,1\pm 0,8\text{mm}$ de large, tout au plus 2 fois plus longues que larges, de couleur vert grisâtre (figure 3.26). Elles sont ovales, oblongues, ciliées à la base (figure 3.27).



Figure 3.26: Feuilles du thym

Figure 3.27: Feuilles ovales, oblongues et ciliées à la base
(Gr x 0,8 x 10) (à la loupe)

Leur face inférieure est feutrée et ponctuée de poils sécréteurs rougeâtres, alors que leur face supérieure est glabre et marquée par une nervure centrale déprimée (Figure 3.28 et 3.29).

Figure 3.28: Face supérieure de la feuille
du thym glabre (Gr x 2,5 x 10)
à la loupeFigure 3.29: Face inférieure de la feuille
(Gr x 2,5 x 10)

3.2.3. Etude macroscopique de la tige

Les tiges sont prostrées, rampantes de $17,8 \pm 3,68$ cm. Elles sont ligneuses à la base, herbacées au sommet et très diffuses (Figures 3.30 et 3.31).

Figure 3.30: Plante de *Thymus guyonii*
(Tiges ligneuses à la base et herbacées à la partie médiane)Figure 3.31: Tige rampante et très diffuse.
(originale, 2014)

3.2.4. Etude microscopique de la tige

La forme de la coupe est de section carrée caractéristique très répandue chez Lamiacées, à cause du dépôt de collenchyme au niveau des quatre angles de la tige. Elle est totalement recouverte de poils épidermiques (poils tecteurs et quelques poils sécréteurs) (Figures 3.32 et 3.33). Les coupes transversales de la tige à main levée (Figure 3.34) et au microtome (Figure 3.35), montrent des tissus caractéristiques, similaires à ceux rencontrés au niveau d'*Origanum floribundum*.

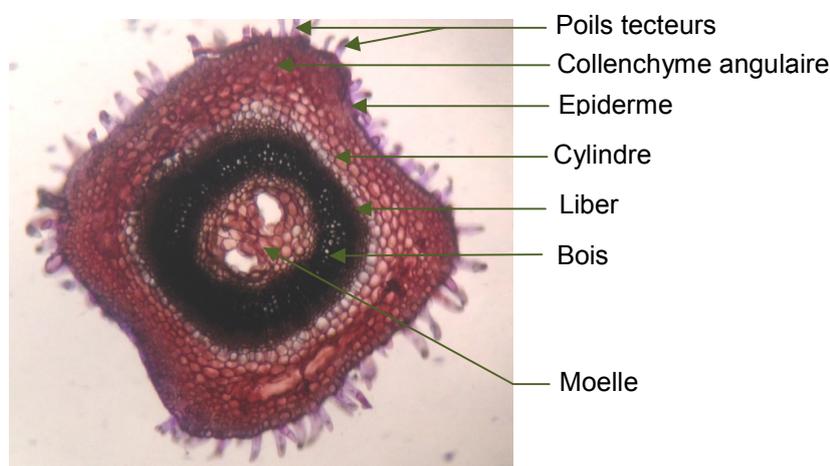


Figure 3.32: Coupe transversale de la tige du thym (Gr x 4 x 10) (au microscope)

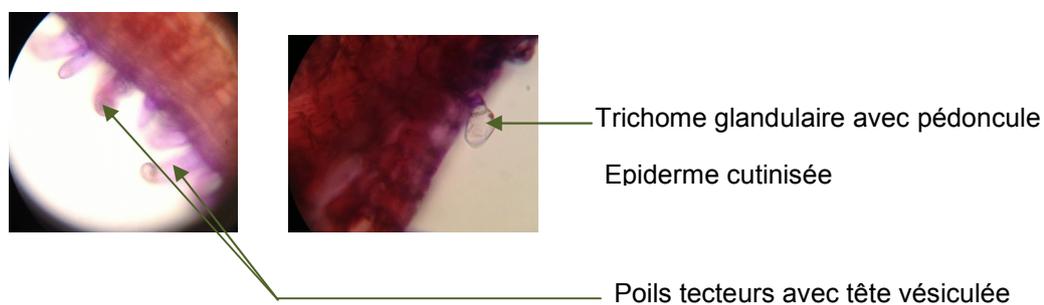


Figure 3.33: Poils tecteurs et trichome de la tige (au microscope)
(Gr x 40 x 10)

(originale, 2014).

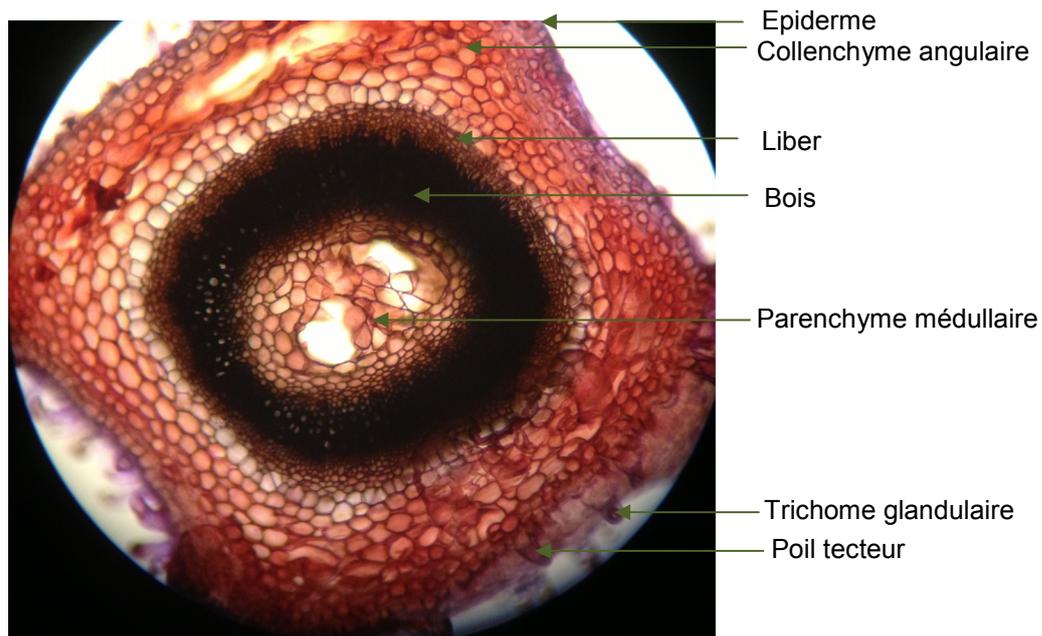


Figure 3.34: Coupe transversale de la tige de *Thymus guyonii*
(Gr x 10 x 10) après double coloration (au microscope)

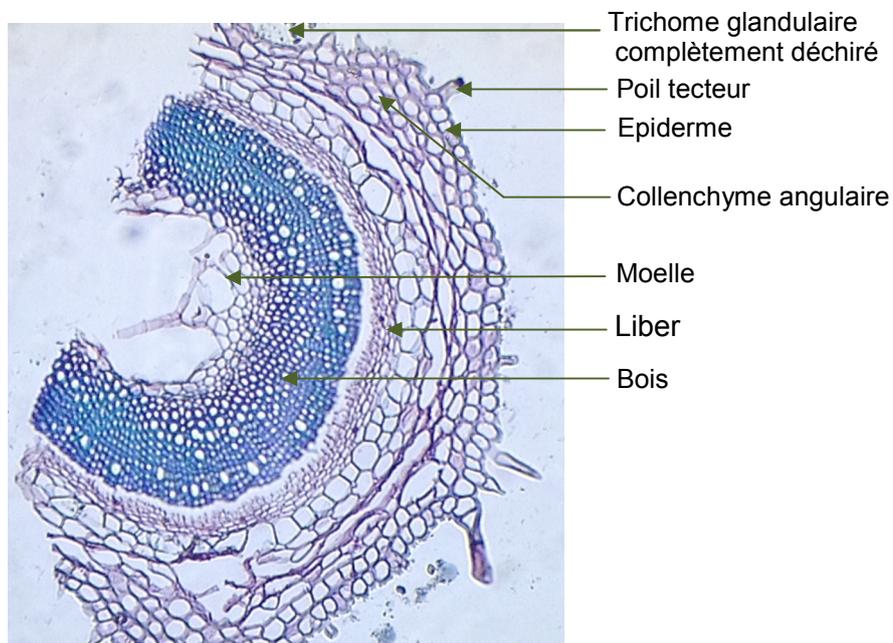


Figure 3.35: Coupe transversale de la tige au microtome
(Gr x 10 x 10) (au microscope)

(originale, 2014)

3.2.5. Etude microscopique de la feuille de thym (coupes à main levée et au microtome)

Les coupes transversales à main levée et au microtome montrent que la feuille est un organe aplati portant des poils tecteurs et trichomes glandulaires (figure 3.36). Elle présente une symétrie bilatérale. La nervure principale ou médiane est apparente au microtome (figure 3.37). Les feuilles étant fines et leur taille minuscule ont rendu les coupes à main levée difficile à effectuer.

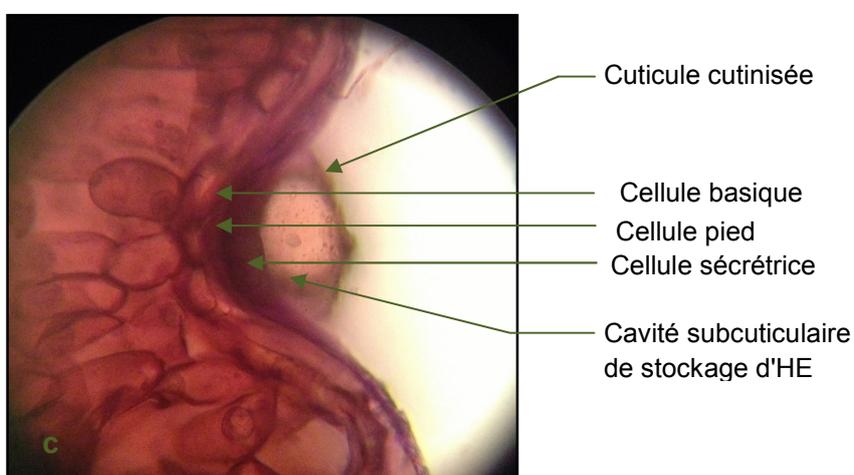


Figure 3.36 : Coupe transversale d'une partie de la feuille du thym

Gr x 40 x 10 (au microscope)

(originale, 2014)

Les coupes au microtome nous ont permis d'observer de façon plus distincte les tissus de la plante difficile à mettre en évidence avec des coupes à main levée car la plante est ligneuse à la base.

Ces coupes nous ont permis de montrer l'aspect des trichomes glandulaires au niveau des feuilles, présents après déchirure (Figure 3.38).

L'étude macroscopique et microscopique nous permet de dire que les sites sécréteurs d'HE sont les trichomes glandulaires. Ils sont présents à la surface des épidermes des organes végétatifs et reproducteurs de *Thymus guyonii*.

Nous avons remarqué que leur abondance sur les feuilles et les fleurs est plus importante.

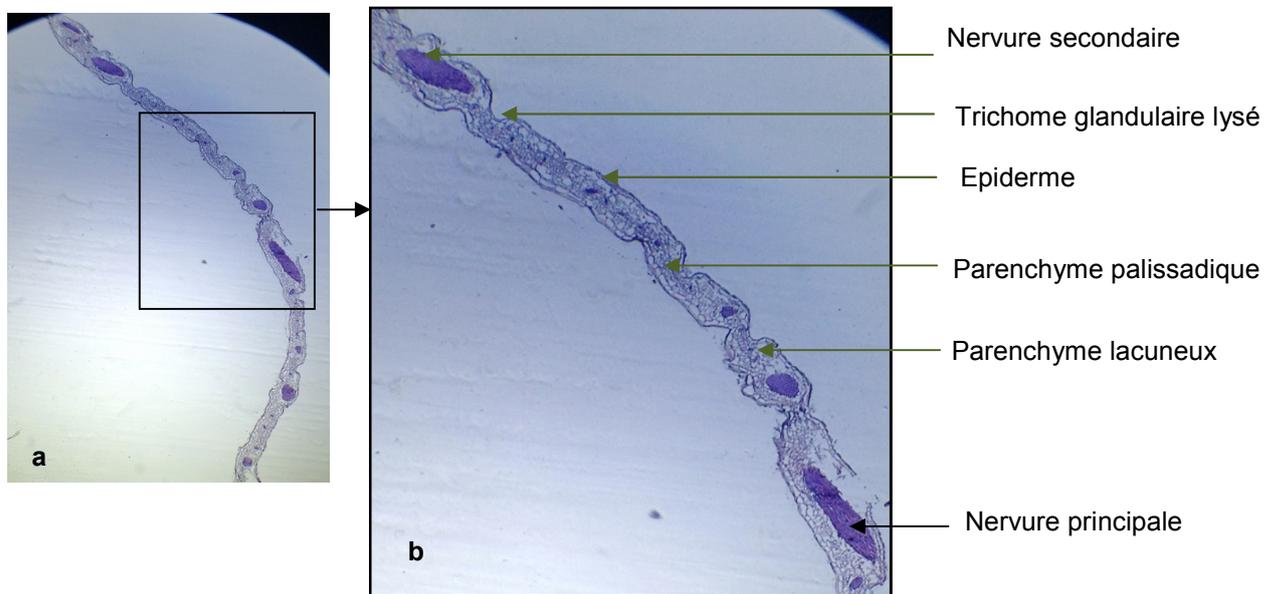


Figure 3.37 : Coupe transversale de la feuille du thym au microtome (Gr x 4 x 10) (a) et (Gr x 10 x 10) (b) (au microscope)

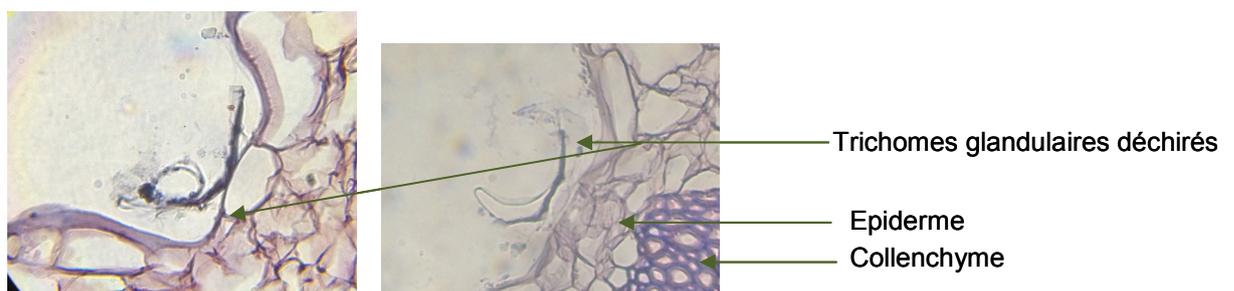


Figure 3.38 : Coupe transversale d'une partie de la feuille au microtome montrant des trichomes lysés (Gr x 4 x 10) (au microscope)

(originale, 2014)

3.3. Extraction et rendement en huile essentielle d'origan et de thym

Nous avons pu récupérer les rendements en HE de l'origan et thym illustrés dans le tableau 3.1 à partir de la matière végétale sèche.

Tableau 3.1: Rendement en HE des deux plantes étudiées

Plantes	Rendement en huiles essentielles (%)
<i>Origanum floribundum</i> Munby	2,6±0,1
<i>Thymus guyonii</i> de Noé	0,98±0,01

Un rendement HE de l'origan de 2,6%±0,1 a été obtenu. Cette valeur est légèrement inférieure à celle citée par Hazzit et *al.*, [33,37] qui est de 2,9%. Elle est supérieure à 1,6%, celle reportée par Brada et *al.*, pour la même espèce [112].

Thymus guyonii a donné un rendement de 0,98%±0,01 est similaire à celui rapporté par Hazzit et *al.*, qui est de 1% [37] et légèrement inférieur à celui cité par Zeghib et *al.*, (1,5%) [113] et Kabouche et *al.*, (2%) [114]. Ces auteurs ont utilisé des techniques d'extraction par hydrodistillation, similaires à nos travaux.

En effet, le rendement peut être influencé par divers paramètres intrinsèques (étapes de croissance et l'âge du matériel végétal) et extrinsèques de la plante comme la période et milieu de récolte, les pratiques culturales, ainsi toutes conditions pédoclimatiques, le séchage et les procédés d'extraction) [115]. Les facteurs abiotiques ou caractéristiques physico-chimiques ont un effet sur le rendement en HE notamment, l'humidité, la température, le temps de l'insolation et les vents qui influencent directement sur les espèces qui ont des structures histologiques de stockage superficielle comme l'origan et le thym [116,117, 118,119,120].

3.3.1. Détermination du taux d'humidité de la matière végétale

Le taux d'humidité a été déterminé pour *Origanum floribundum* et *Thymus guyonii* à l'état frais et sec (parties aériennes), les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Taux d'humidité de la matière végétale.

	La quantité d'eau dans la matière végétale (ml)	Le taux d'humidité (%)
Origan frais	5,1	50,90
Origan sec	0,99	09,88
Thym frais	/	/
Thym sec	0,02	0,2

Nous remarquons que l'origan étudié n'est pas très riche en eau de part sa constitution physiologique (plante ligneuse). Après séchage de la plante, il y'a eu élimination du 4/5 d'eau. Nous avons séché la plante à l'air libre à température $25 \pm 1^\circ\text{C}$, durant trois semaines jusqu'à stabilité du poids. Le thym d'Aflou est très pauvre en eau, de part le climat de la région semi-aride et sec. Nous n'avons pas pu avoir la plante à l'état frais pour cette mesure.

Dans le but d'avoir le maximum d'HE, l'eau a été éliminée pour concentrer les principes actifs de la plante et pour avoir un meilleur rendement en HE [34,121, 122].

3.3.2. Etude de la cinétique d'extraction

Ces expérimentations nous ont permis de suivre la cinétique d'extraction et l'évolution du rendement en HE de l'origan et le thym en fonction du temps. Elles sont présentées dans la figure 3.39.

Les courbes de la cinétique d'extraction des HE (figure 3.39), se caractérisent par une partie ascendante où la majeure fraction de l'huile extraite correspond à un temps de 80 minutes pour l'origan et 70 minutes pour le thym. L'allure des courbes représentée présente trois étapes :

- La première étape est caractérisée par une augmentation rapide de l'extraction au bout de 60 minutes pour l'origan et 45 minutes pour le thym, pour atteindre un rendement de 1,46% (g / 100g de matière végétale sèche d'origan) et 1,31% (g / 100g de matière végétale sèche de thym). Cela peut s'expliquer par un entraînement massif des l'HE situées sur la surface du végétal par la vapeur produite, où 90% de l'HE totale a été récupérée pour l'origan et 98% pour le thym.

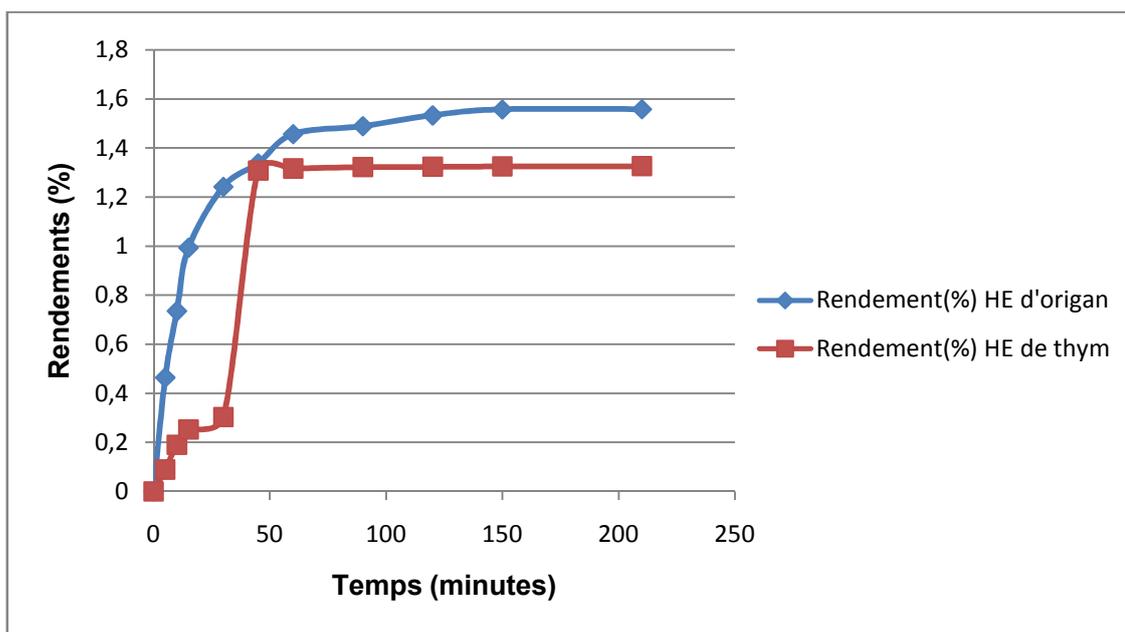


Figure 3.39 : Cinétique d'extraction de l'HE d'*Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii*.

- Durant la deuxième étape (60-120) minutes pour l'origan et (45-60) minutes pour le thym, nous constatons une nette régression de l'extraction par rapport à l'étape précédente où le taux d'extraction diminue jusqu'à 0,07% de la valeur de la quantité globale recueillie pour l'origan et 0,02% pour le thym. Ceci s'explique par une hydrodiffusion lente des HE qui sont restées piégées dans les organes sécréteurs de la matière végétale.
- La dernière étape correspondant à la stagnation du rendement. Elle indique la fin de l'extraction. Elle nous permet aussi de déduire une durée maximale égale à 120 - 180 minutes pour l'origan et 60 - 120 minutes pour le thym, pour avoir un maximum de rendement.

Après deux heures d'extraction, nous avons récupéré la totalité des HE qui étaient emmagasinées au niveau des trichomes glandulaires d'*Origanum floribundum* et une heure d'extraction au niveau de *Thymus guyonii*.

3.4. Caractérisation des huiles essentielles de l'origan et du thym

Nous avons déterminé les caractéristiques organoleptiques, indices physico-chimiques ainsi que l'analyse qualitative et semi-quantitative de l'HE d'origan et du thym par CG/SM comme suit :

3.4.1. Caractéristiques organoleptiques

L'odeur de l'HE d'origan et du thym sont caractéristiques, aromatiques, phénoliques, agréables avec un fond légèrement épicé et amère plus accentué au niveau du thym (tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE des espèces étudiées.

Espèce	Aspect	Couleur	Odeur	Flaveur
<i>Origanum floribundum</i>	Liquide limpide, mobile	Jaune pâle	Fortement aromatique	Phénolique épicée et amère
<i>Origanum</i> type Espagne (AFNOR, 2000)	Liquide mobile, limpide	Jaunâtre à brun foncé	Fortement aromatique	Phénolique épicée
<i>Thymus guyonii</i>	Liquide limpide	Jaune foncé	Particulière aromatique	Phénolique avec fond épicé et amère
Thym d'Espagne (AFNOR, 2000)	Liquide limpide	Brun rouge	Aromatique	Phénolique agréable avec un fond légèrement épicé

Les paramètres organoleptiques de l'HE étudiée sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR (2000) [49].

3.4.2. Indices physico-chimiques

Nous avons déterminé les constantes physico-chimiques selon des procédés normalisées (AFNOR, 2000) [49]. Les résultats de ces mesures sont regroupés dans le tableau 3.4.

Tableau : 3.4 : Caractéristiques physico-chimiques de l'HE des espèces étudiées.

Paramètres physico-chimiques						
	Indice d'acide	Indice d'ester	Densité à 20°C	Indice de réfraction	Pouvoir rotatoire	Miscibilité à l'éthanol à 70°
<i>Origanum floribundum</i>	2,00	25	0,91	1,47	0,30°	1v/4v
Origan type d'Espagne AFNOR (2000)	/	/	0,93-0,95	1,50-1,51	-5° et +2°	1v/4v
<i>Thymus guyonii</i>	2,14	39,93	0,930	1,50	0,82°	1v/3v
Thym à thymol type d'Espagne AFNOR (2000)	/	/	0,910-0,937	1,496-1,505	/	1v/3v

Nous avons remarqué que les paramètres physico-chimiques des HE sont en accord avec ceux mentionnés par les normes d'AFNOR, (2000) [49].

L'indice d'acide (IA) montre le taux des acides gras libres dans l'HE. Un résultat élevé indique une dégradation d'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation. Inversement, un IA inférieur à 2 est un indice de bonne conservation de l'HE [123]. L'IA obtenu est de 2,00 pour l'origan et 2,14 pour le thym, ces valeurs mentionnent que les HE obtenues sont presque stables et ne provoquent pas d'oxydation inquiétante (bonne conservation des HE extraites) [124].

Les faibles indices de réfraction des HE (1,47-1,49) indiquent leur faible réfraction de la lumière. Cette constatation confirme nos résultats où nous obtenons 1,47 pour l'origan et 1,50 pour le thym, ce qui pourrait favoriser leur utilisation dans les produits cosmétiques [125, 126].

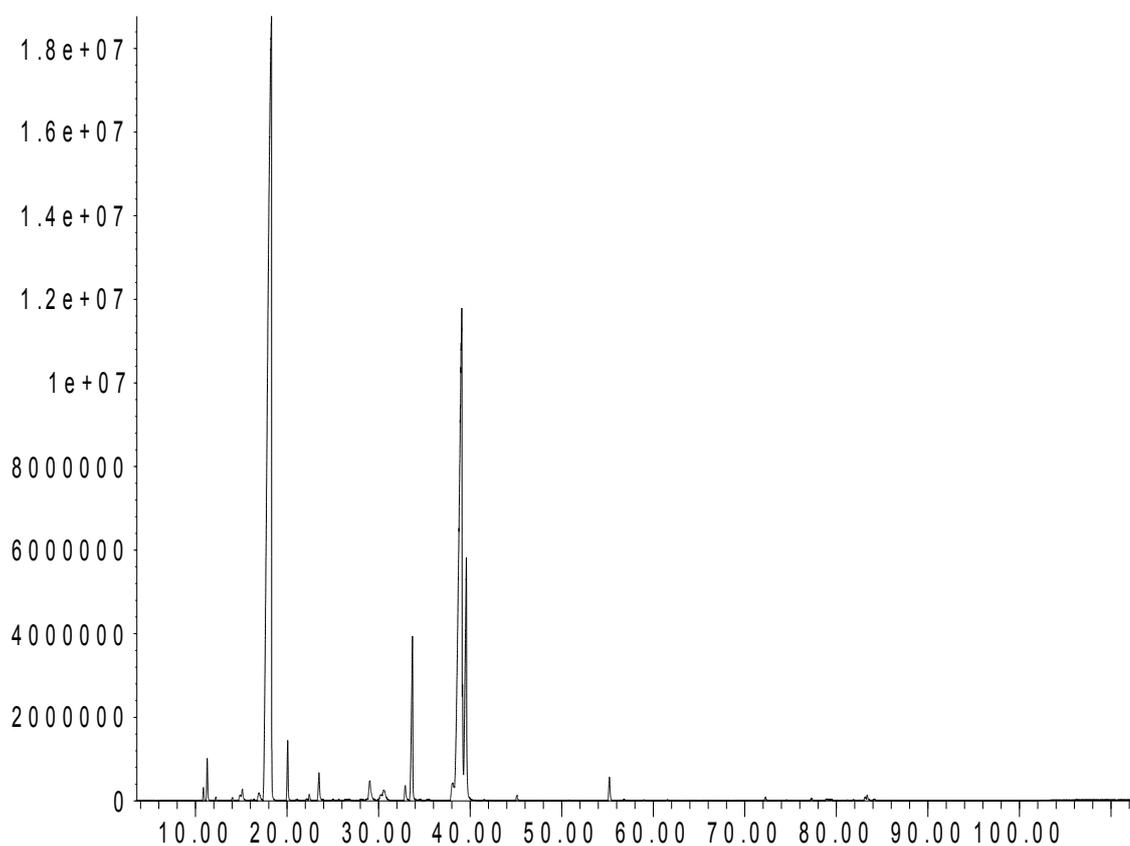
La détermination des propriétés physico-chimiques est une partie nécessaire mais demeure insuffisante pour caractériser l'HE. Il est recommandé de déterminer le profil chromatographique de l'HE qui est l'identité de l'HE [127].

3.4.3. Analyses qualitative et semi-quantitative des HE par CPG/SM

L'identification des composés de l'HE par CG/SM de l'origan et du thym a été essentiellement basée sur la comparaison des spectres de masse de la molécule inconnue à celui d'un composé pur fourni par la base des données informatiques [33].

Les profils chromatographiques des HE étudiées sont représentés dans ces figures 3.40 et 3.41 ainsi que le tableau 3.5.

Abundance



Time -->

Figure 3.40: Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle d'*Origanum floribundum* de Hammam Melouane-Blida.

L'analyse par CG/SM de l'HE d'*Origanum floribundum* issu de Hammam Melouane nous a permis d'identifier 27 molécules représentant 99,8% de la composition totale (tableau 3.5) et (figures 3.42, 3.43, 3.44).

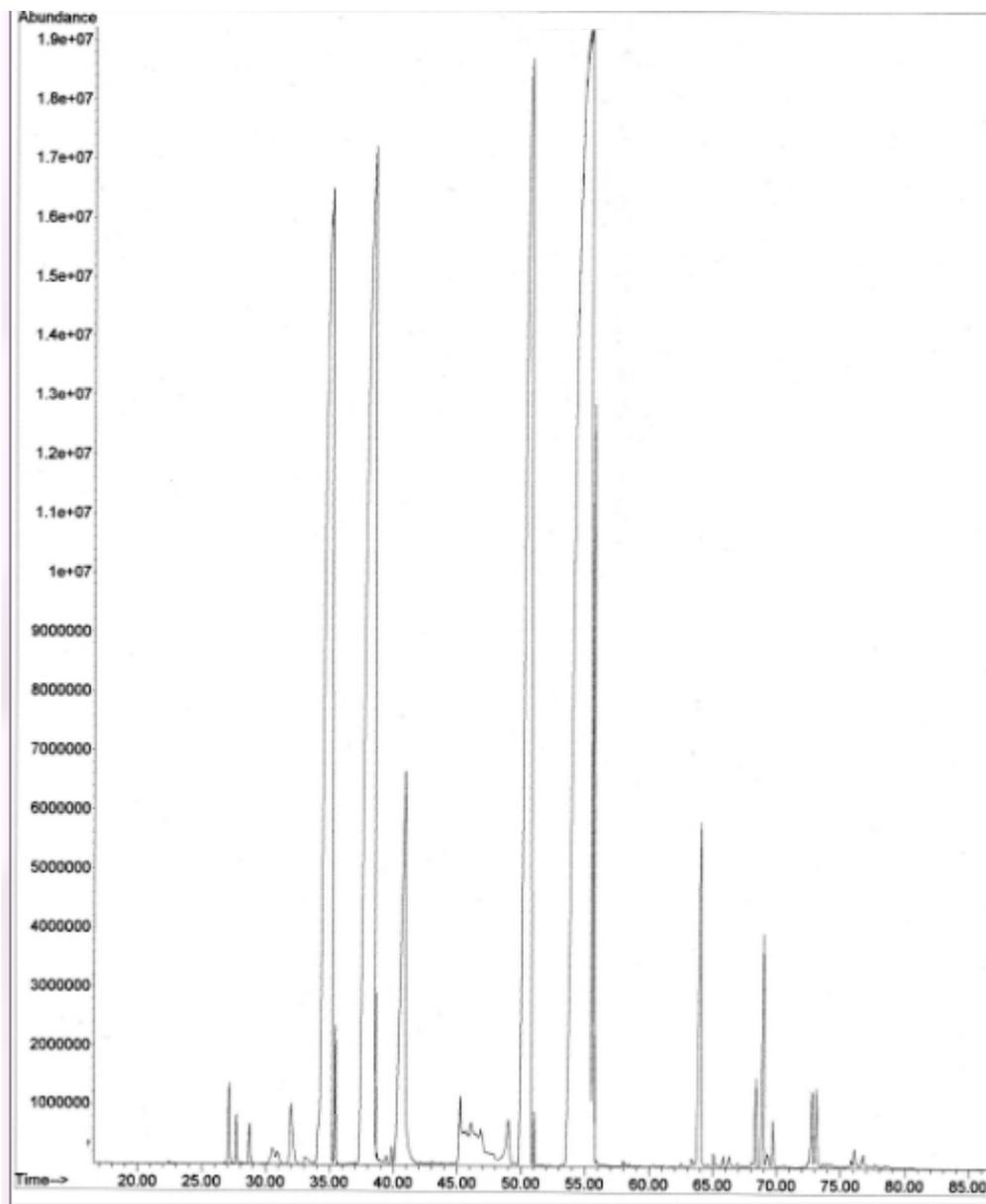


Figure 3.41: Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* d'Aflou-Laghoutat.

L'huile essentielle de *Thymus guyonii* d'Aflou, a été identifiée par CG/SM où 60 composés à 98,2% de sa composition totale ont été identifiés (tableau 3.5) et (figures 3.45, 3.46, 3.47).

Tableau 3.5 :Composition chimique de l'HE (%) des deux espèces étudiées

	Composés	Indice de Rétention (IR)	% du composant d' <i>Origanum floribundum</i>	% du composant De <i>Thymus guyonii</i>	Identification
1	3-Heptanone	886	/	t	IR-SM
2	Tricyclene	923	/	t	IR-SM
3	α -Thujene	927	0,2	0,3	IR-SM
4	α -Pinene	936	0,7	0,1	IR-SM-ET
5	Camphene	950	0,1	0,1	IR-SM-ET
6	1-Octen-3-ol	980	0,2	t	IR-SM
7	3-Octanone	985	/	0,1	IR-SM
8	β -Pinene	978	0,1	0,7	IR-SM-ET
9	β -Myrcene	989	0,3	0,4	IR-SM-ET
10	α -Phellandrene	1004	t	0,1	IR-SM-ET
11	δ -3-Carene	1011	t	t	IR-SM-ET
12	α -Terpinène	1017	0,3	0,1	IR-SM-ET
13	p-Cymène	1024	53,4	15,5	IR-SM-ET
14	Limonene	1030	/	0,2	IR-SM-ET
15	β -Phellandrene	1030	/	0,1	IR-SM
16	cis- β -Ocimene	1038	/	t	IR-SM
17	trans- β -Ocimene	1048	/	t	IR-SM
18	γ -Terpinene	1060	1,1	18,7	IR-SM-ET
19	cis-Sabinene hydrate	1067	/	0,2	IR-SM
20	1-Nonen-3-ol	1085	/	t	IR-SM
21	3-Nonanone	1087	/	t	IR-SM
22	Linalool oxide	1075	0,1	/	IR-SM
23	Terpinolene	1087	t	t	IR-SM-ET
24	p-Cymenene	1088	0,2	t	IR-SM
25	trans-Sabinene hydrate	1098	/	t	IR-SM
26	Linalool	1099	0,6	4,0	IR-SM-ET
27	Camphor	1143	/	t	IR-SM-ET
28	Borneol	1166	/	1,3	IR-SM-ET
29	4-Terpineol	1077	0,7	/	IR-SM-ET
30	α -Terpineol	1190	/	0,4	IR-SM-ET
31	p-Cymen-8-ol	1184	0,6	/	IR-SM
32	Thymol methyl ether	1234	0,4	15,2	IR-SM
33	Carvacrol methyl ether	1243	3,9	0,1	IR-SM
34	Nerol	1229	/	t	IR-SM
35	Thymoquinone	1260	t	/	IR-SM
36	Thymol	1290	27,8	35,8	IR-SM-ET
37	Carvacrol	1300	8,4	2,2	IR-SM-ET
38	Nonyl acetate	1309	/	0,1	IR-SM
39	Thymol acetate	1356	/	t	IR-SM
40	Eugenol	1358	/	t	IR-SM-ET
41	α -Copaene	1376	/	t	IR-SM
42	β -Bourbonene	1384	/	t	IR-SM
43	β -Elemene	1390	/	t	IR-SM
44	β -Caryophyllene	1420	0,1	1,5	IR-SM
45	trans- α -Bergamotene	1435	/	t	IR-SM
46	Aromadendrene	1441	/	t	IR-SM
47	cis- β -Farnesene	1446	/	t	IR-SM
48	α -Humulene	1453	/	t	IR-SM
49	Alloaromadendrene	1460	/	t	IR-SM
50	Germacrene D	1481	/	t	IR-SM
51	Ledene	1486	/	t	IR-SM
52	Bicyclogermacrene	1494	/	0,2	IR-SM
53	β -Bisabolene	1508	t	t	IR-SM

54	γ -Cadinene	1513	t	0,1	IR-SM
55	δ -Cadinene	1523	/	0,10	IR-SM
56	cis-Calamenene	1523	t	/	IR-SM
57	Cadina-1,4-diene	1531	/	t	IR-SM
58	α -Muuroolene	1498	/	t	IR-SM
59	cis- α -Bisabolene	1540	/	t	IR-SM
60	Spathulenol	1576	/	0,3	IR-SM
61	Caryophyllene oxide	1581	0,6	0,2	IR-SM
62	Viridiflorol	1691	/	t	IR-SM
63	t-Cadinol	1635	/	0,1	IR-SM
64	β -Eudesmol	1550	/	t	IR-SM
65	α -Cadinol	1652	/	t	IR-SM
	Nombre de molécules identifiées		27	60	
	Composés identifiés (%)		99,8	98,2	
	Hydrocarbures monoterpéniques		56,4	36,3	
	Monoterpènes oxygénés		42,5	59,3	
	Hydrocarbures sesquiterpéniques		0,1	1,9	
	Sesquiterpènes oxygénés		0,6	0,6	
	Autres		0,2	0,1	

Composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne apolaire HP5MS; t: trace (<0,05%).

IR : Indices de rétentions relatifs à la série d'alcane C_7 - C_{17} comparés par rapport à ceux de la littérature [44, 128, 129, 130].

SM : composés identifiés par comparaison de leurs spectres de masse par rapport à ceux des banques de spectres (NIST 2005 et Wiley 7N) [33].

ET: étalon.

Les résultats obtenus (tableau 3.5) ont montré que le composé principal chez *Origanum floribundum* est le **p-cymène à 53,4%**, suivi du thymol à 27,8%, du carvacrol à 8,4%, du carvacrol methyl ether à 3,9% et α -terpinène à 1,1% (figures 3.42, 3.43, 3.44).

Le chémotype de *Thymus guyonii* est un monoterpène oxygéné (**thymol**) avec une teneur de **35,8%**, suivi du α -terpinène à 18,7%, du p-cymène à 15,5%, du thymol methyl ether à 15,2%, du linalool à 4% et carvacrol à 2,2% (figures 3.45, 3.46, 3.47).

Figure 3.42 : Différents constituants d'*Origanum floribundum*

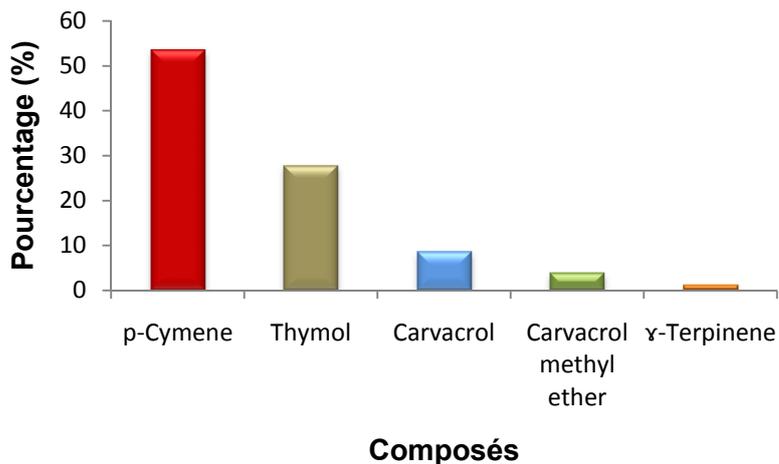
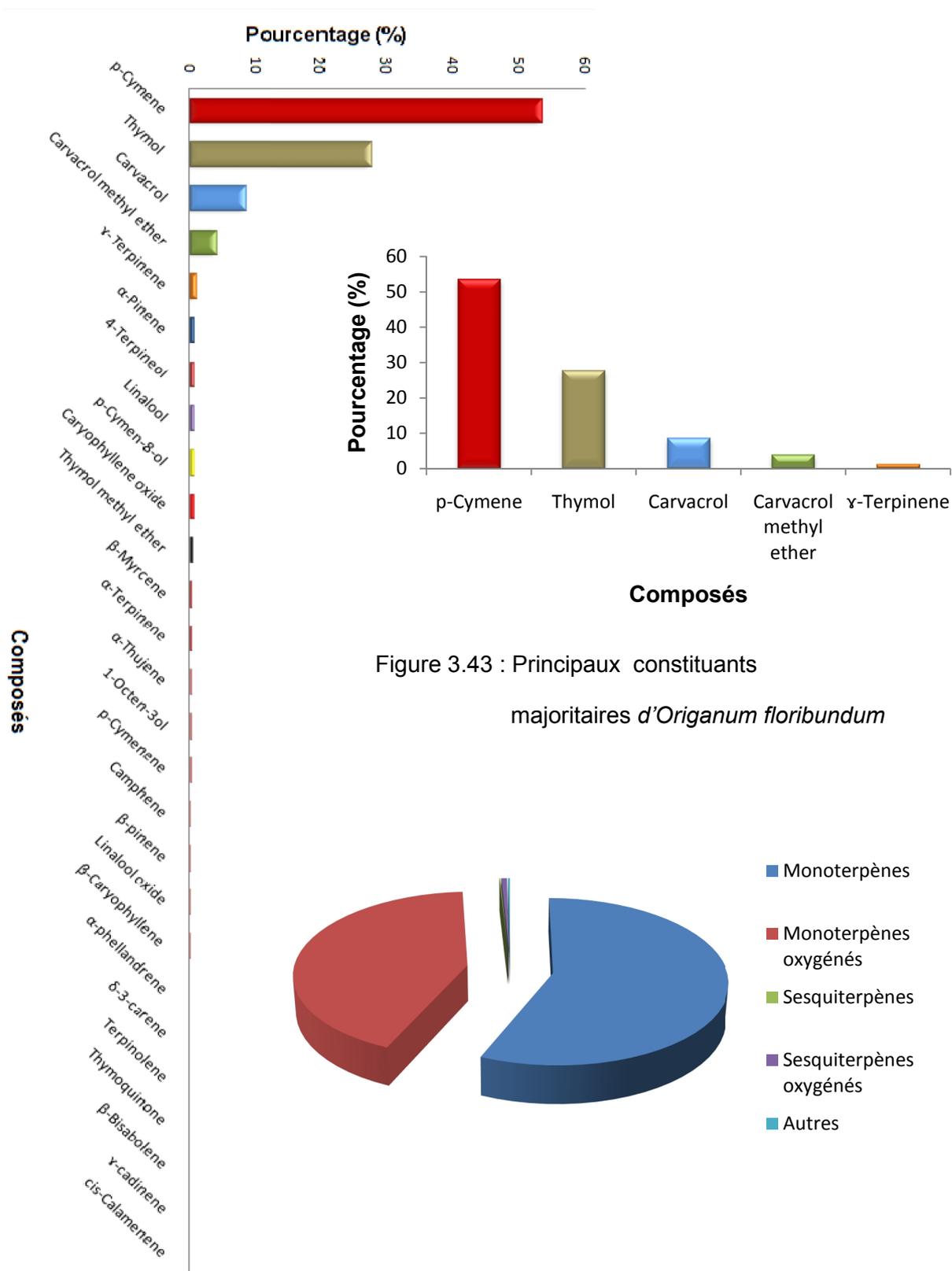


Figure 3.43 : Principaux constituants majoritaires d'*Origanum floribundum*

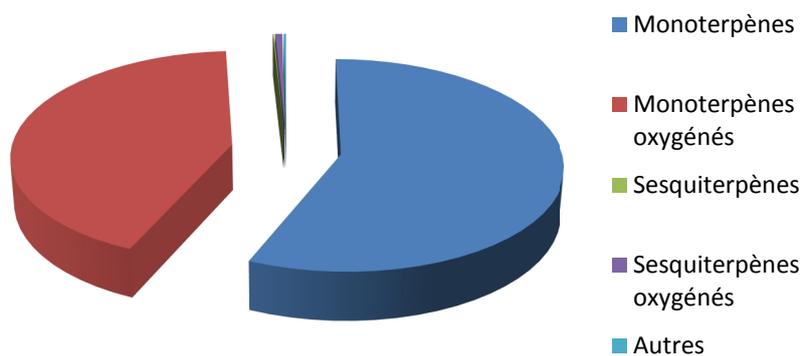


Figure 3.44 : Secteurs de différentes classes chimiques d'*Origanum floribundum*

Figure 3.45 : Différents constituants de *Thymus guyonii*

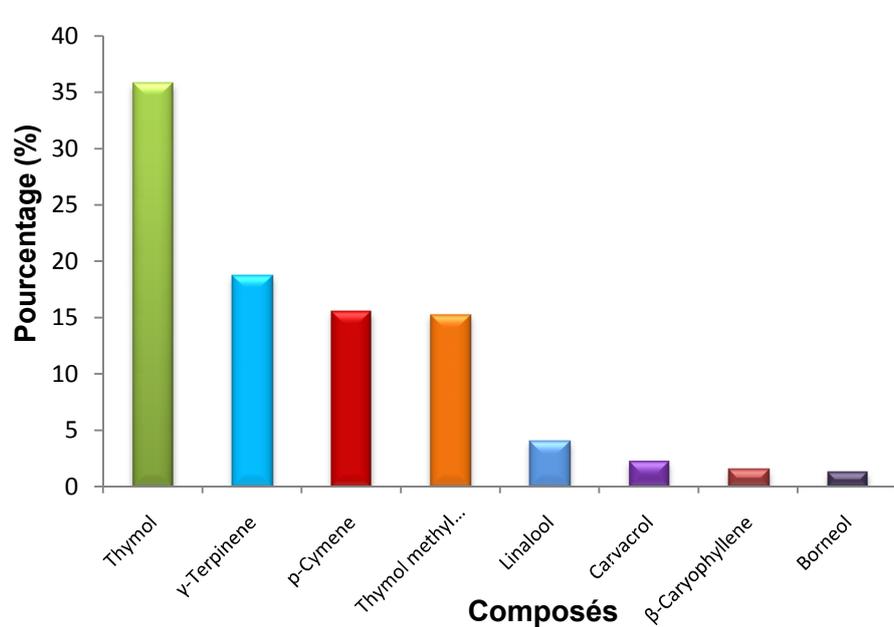
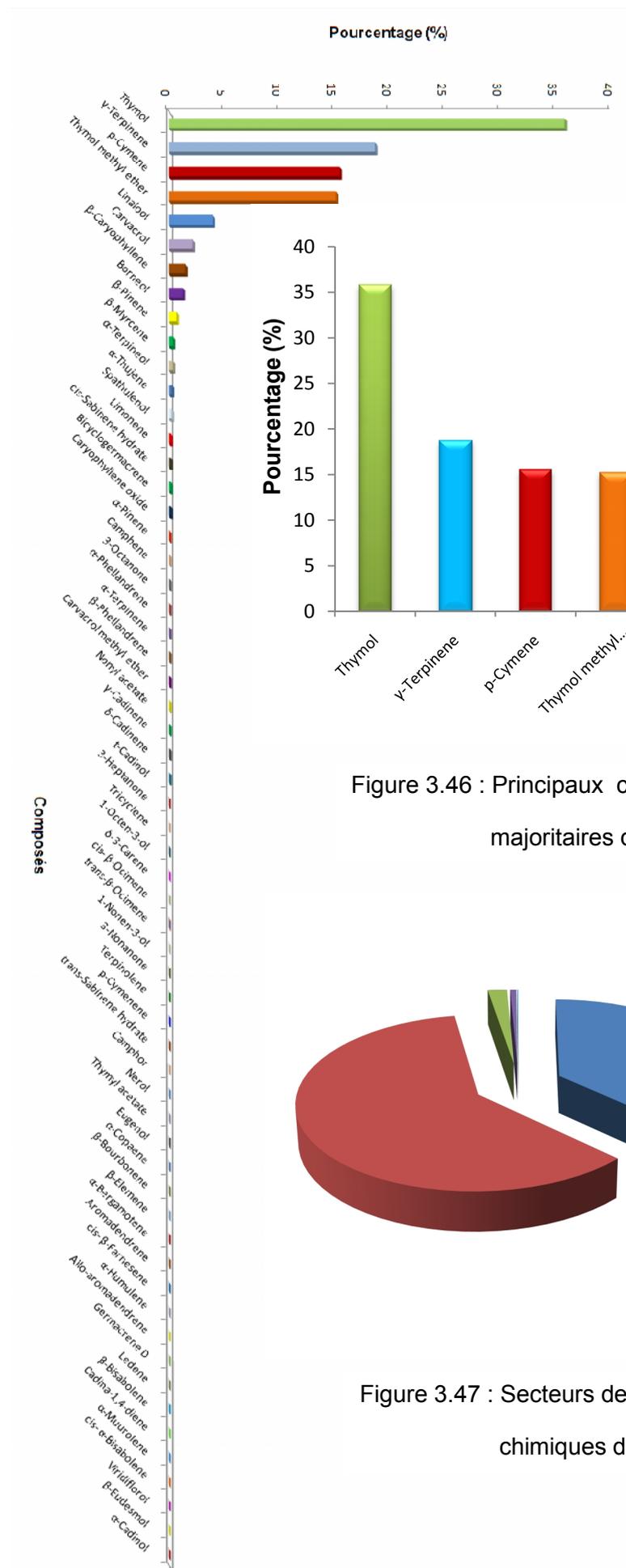


Figure 3.46 : Principaux constituants majoritaires de *Thymus guyonii*

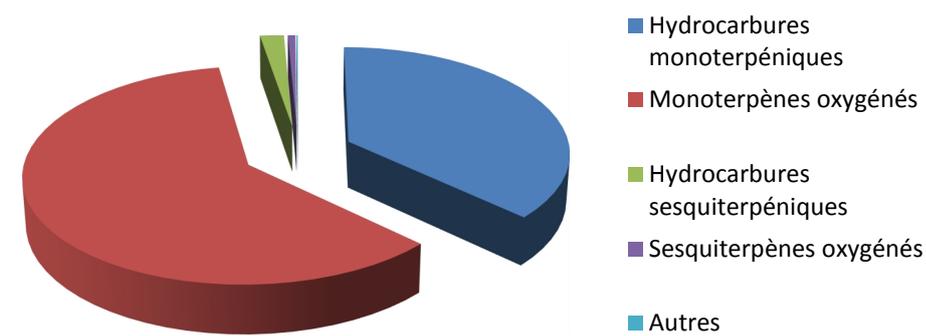


Figure 3.47 : Secteurs de différentes classes chimiques de *Thymus guyonii*

Nous avons comparé HE d'origan étudiée avec celles provenant de Chréa, Kadiria, Tizi-ouzou, Guelma, Lakhdaria et Khemis Miliana (tableau 3.6).

Tableau 3.6 : Comparaison entre les teneurs (%) des composés majoritaires des HE d'*Origanum floribundum* d'Algérie selon les régions.

Composé	Oé	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉	O ₁₀
Thymol	27,8	8,4	33,6	27,3	1,1	9,9	13,2	1,4	50,47	33,6	0,8
p-Cymene	53,4	18,5	15,5	24,9	12,4	31,5	17,1	42,6	24,22	15,5	27,6
γ – Terpinene	1,1	13,7	19,9	22,3	12,2	7,7	16	3,2	11,27	19,9	34,1
Carvacrol methyl ether	3,9	6,9	0,2	3,6	–	–	–	3,9	–	0,2	trace
Carvacrol	8,4	29,6	8,5	1,6	40,0	35,0	33	37,0	4,68	8,5	9,6
β-Myrcene	0,3	2,9	3,6	4,8	1,5	–	0,4	0,4	–	3,6	3,7

O₆ : *Origanum floribundum* de Hammam Melouane (Echantillon testé).

O₁ : *Origanum floribundum* de Chréa (Blida) (Hazzit, 2008) [33].

O₂ : *Origanum floribundum* de Kadiria (Hazzit, 2008) [33].

O₃ : *Origanum floribundum* de Hammam Melouane (Hazzit, 2008) [33].

O₄ : *Origanum floribundum* de Chréa (Baser, 2000) [111].

O₅ : *Origanum floribundum* de Chréa (Houmani, 2002) [131].

O₆ : *Origanum floribundum* de Tizi-Ouzou (Harfi et Aggoune, 2006) [132].

O₇ : *Origanum floribundum* du parc de Chréa (Daoudi-Merbah et al., 2016) [133]

O₈ : *Origanum floribundum* de Guelma (Ksouri et al., 2017) [134].

O₉ : *Origanum floribundum* de Lakhdaria (Kerbouche et al., 2015) [135].

O₁₀ : *Origanum floribundum* de Khemis Miliana (Brada et al., 2012) [112].

L'HE d'*Origanum floribundum* que nous avons étudié est un chémotype à p-Cymène (53,4%). Ce dernier composé forme avec le thymol et le carvacrol la quasi-totalité de l'HE (89,6%). Le p-cymène est un nouveau chémotype cité pour la première fois par Daoudi-Merbah et al., 2016 (O₇) avec une valeur de 42,6% (tableau 3.6) [133]. Ce chémotype a été mentionné chez l'autre espèce d'origan de Tunisie, qui est *Origanum glandulosum* [136, 137].

Le carvacrol, composé majoritaire des HE des échantillons de Chréa (O₁, O₄, O₅ et O₆). Le thymol un deuxième chémotype très rencontré chez l'origan, il s'agit du thymol des échantillons (O₂, O₃, O₈ et O₉).

Les deux composés p-cymène et γ terpinène qui sont les précurseurs biogénétiques du thymol et carvacrol peuvent parfois être rencontrés dans des proportions plus ou moins similaires. C'est le cas des échantillons (O₃, O₄ et O₆). Il a été également rapporté que le γ -Terpinene était le composé le plus important de l'HE d'*Origanum floribundum* de Khemis Miliana avec une proportion de 34,1% (O₁₀) [112].

Des similarités et des différences pouvant être très importantes au niveau de la même espèce et au sein des autres espèces du même genre. Cependant, dans tous les cas le thymol, son isomère le carvacrol et leurs précurseurs biogénétiques (p-cymène et γ -terpinène) forment la majeure partie des HE d'origan avec une teneur de plus de 70% [138,139].

Nous avons également comparé les composants majeurs de HE de thym étudiée (Té) d'Aflou, avec ceux provenant de Msila, de Ghardaia et de Djelfa (tableau 3.7). Car de très peu d'études ont été faites sur *Thymus guyonii* d'Algérie.

Tableau 3.7: Comparaison entre les teneurs (%) des composés d'HE de *Thymus guyonii* étudiées d'Algérie.

Composé	Té	T1	T2	T3
Thymol	35,8	21,18	19,5	10,9
γ -Terpinene	18,7	5,7	1,13	13,0
p-Cymene	15,5	9,7	6,25	18,6
Methyl thymol	15,2	–	–	10,7
Linalool	4	1,1	0,10	6,1
Carvacrol	2,2	55,5	55,55	4,2

Té: *Thymus guyonii* d'Aflou (Echantillon testé).

T1: *Thymus guyonii* de Msila (Zeghib et al., 2017) [140].

T2: *Thymus guyonii* de Ghardaia (Kabouche et al., 2013 et 2014) [141,142].

T3: *Thymus guyonii* de Djelfa (Hazzit et al., 2006) [33, 37].

Le composé majeur de l'HE étudié (Té) est le thymol avec une valeur de 35,8% (Tableau 3.7), celui de Msila et Ghardaia (T₁ et T₂) est le carvacrol (55,5% et 55,55%). Par contre celui de Djelfa (T₃) est le p-cymène à 18,6% (Tableau 3.7).

Nous avons remarqué comme pour l'origan que la composition des HE de thym est majoritairement formé de carvacrol et thymol comme composés principales et précurseurs biogénétiques qui sont p-cymène et α -terpinène, qui forment la proportion la plus élevée.

Les variations observées dans la composition chimique des HE, d'une manière qualitative et quantitative, peuvent être dues à l'âge de la plante, à la période du cycle végétatif, à la partie de la plante utilisée et à certains facteurs écologiques, ou même à des facteurs génétiques [143, 144, 145, 20, 146, 147].

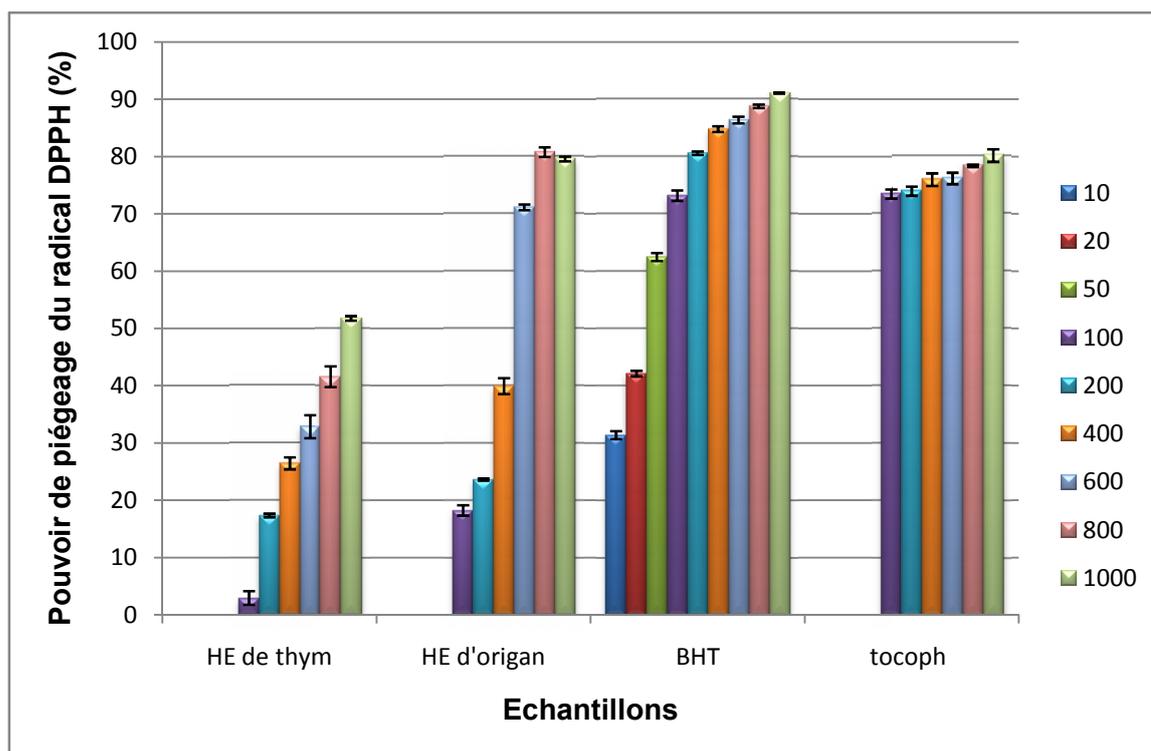
3.5. Evaluation de l'activité antioxydante d'HE de l'origan et du thym

L'activité antioxydante des HE d'*Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii* a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction du radical DPPH, qui est suivie par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517nm.

Le pouvoir réducteur est mesuré par le virage de la couleur jaune vers le bleu vert mesurée à 700 nm.

3.5.1 Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Les résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH par les HE d'origan, du thym, ainsi que ceux du BHT et du tocophérol sont rapportés dans l'Appendice F₁ et la figure 3.48.



HE : Huile essentielle; BHT : Butyl hydroxy toluène; tocoph : tocophérol.

Figure 3.48 : Représentation graphique du pouvoir d'inhibition du radical DPPH par les échantillons d'HE et les standards (BHT et tocophérol).

Le pouvoir de piégeage du radical stable DPPH de l'HE d'origan et du thym se distingue puisqu'il est capable de réduire la forme stable du radical vers le Diphénylpicrylhydrazine (coloration jaune).

L'activité antioxydante de l'HE de l'origan, du thym étudiée, du BHT et du tocophérol augmente d'une manière proportionnelle avec l'augmentation de la concentration. Elle débute de 19% pour la concentration de 100 pour l'HE d'origan, et atteint le seuil de 80% à la concentration 800.

L'HE du thym débute à 4% pour la concentration 100 et aboutit 50% à la concentration 1000. Il apparaît clairement que l'HE d'origan présente une capacité de réduction du radical DPPH plus élevée que celle du thym, comparable à celles du tocophérol et BHT à partir des concentrations 600 mg/l (figure 3.48) et (appendice F₁).

L'activité de l'HE peut être due à sa teneur en thymol, ce dernier est un composé phénolique capable de piéger les radicaux libres grâce aux groupements hydroxyles dans sa structure chimique [148, 149, 150].

Plusieurs travaux montrent que les composés phénoliques jouent un rôle important dans l'extraction des radicaux libres [137]. En plus du thymol, nous retrouvons le carvacrol, γ terpinène [151], p-cymène [58], carvacrol méthyl ether et thymol méthyl ether. Tous ces composants d'HE d'origan et du thym pourraient exercer à côté d'autres composés mineurs un effet de synergie entre eux et donneraient une activité antioxydante plus importante [152].

La valeur IC_{50} déterminée en mg/l exprime la concentration inhibitrice de 50% des molécules de DPPH mises en solution. Une faible valeur en IC_{50} est reliée avec grande activité en DPPH. L' IC_{50} de l'huile essentielle d'origan a été calculée à $500,71 \pm 16,97$ mg / l tandis que celle du BHT est égale à $23,73 \pm 0,27$ mg / l. Ce résultat est inférieure au IC_{50} de la même espèce d'origan provenant de Lakhdaria [135] qui est de $250 \pm 1,5$ μ g / ml et supérieur à $521,1 \pm 18,0$ mg / l d'origan de Hammam Melouane rapporté par Hazzit et *al.*, [37].

Le calcul de IC_{50} de l'huile essentielle du thym nous a permis d'avoir la valeur de $984,87 \pm 07,06$ mg / l. Cette valeur est plus élevée que celle trouvée par Hazzit et *al.*, [33,37] de la même espèce de Djelfa avec $826,5 \pm 18,0$ mg / l.

Cette différence peut s'expliquer par la différence dans la composition chimique des huiles essentielles étudiées. Les composés phénoliques comme le thymol et cavacrol favorisent plus l'activité au DPPH [153].

L'étude statistique (ANOVA 2) (appendice H₂) nous a permis de mettre en évidence l'effet significatif de la nature de l'antioxydant (HE d'origan, celui du thym, BHT et tocopherol) et de la concentration sur le pouvoir de piégeage du radical DPPH.

Le test de Newman-Keuls [154, 155] nous a permis de classer ces variables selon leurs activités de piégeage du DPPH (appendice H 2.1.1) comme suit :

- Les antioxydants BHT > tocophérol > HE origan > HE thym
- Les concentrations 1000 > 800 > 600 > 400 > 200 > 100 mg/l

3.5.2. Pouvoir réducteur

Les résultats du pouvoir réducteur des HE d'origan et du thym étudiées, BHT, tocophérol et acide ascorbique exprimés par l'absorbance à 700 nm, sont résumés dans la (figure 3.49) et l'appendice F2.

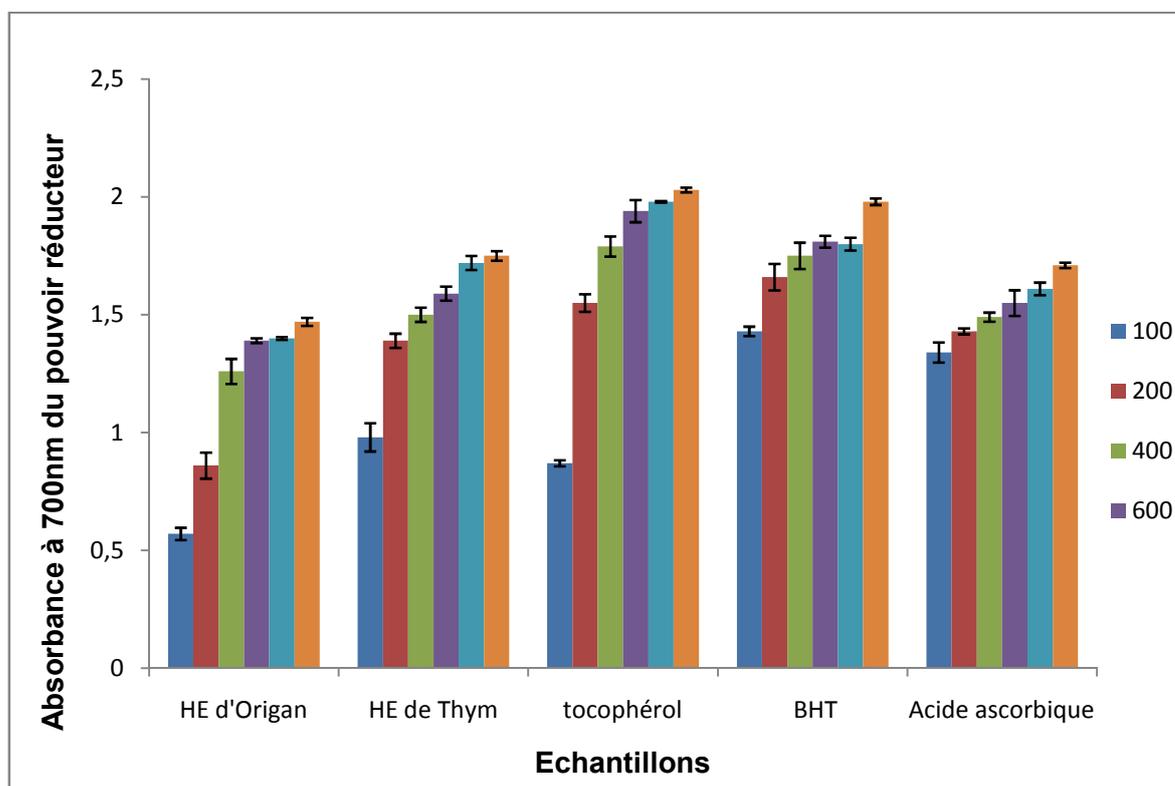


Figure 3.49 : Test du pouvoir réducteur de l'HE des espèces étudiées en comparaison aux antioxydants de références: tocophérol, BHT et acide ascorbique.

Une quantité de Fe^{2+} complexe peut alors être suivie en mesurant la formation du bleu de Prusse $Fe_4 (Fe(CN)_6)_3$ à 700nm des pouvoirs réducteurs des huiles extraites d'origan, de thym et des composés de références le tocophérol, BHT et de l'acide ascorbique en fonction des concentrations des échantillons. Les résultats obtenus sont nettement plus faibles que ceux du tocophérol et BHT. Néanmoins, l'huile d'origan a donné des valeurs d'absorbance proches de celles de l'acide ascorbique dans la gamme des concentrations 600-1000mg / l.

Nous constatons que l'huile essentielle d'origan a un pouvoir réducteur qui augmente avec la concentration (figure 3.49). Elle est légèrement inférieure en comparaison avec ceux du tocophérol, BHT et acide ascorbique.

L'huile essentielle de thym a montré des valeurs légèrement inférieures aux antioxydants de référence. Mais à partir de la concentration 400mg/l, il a donné des valeurs plus élevées que l'acide ascorbique.

Plusieurs auteurs attribuent le pouvoir réducteur des HE à la présence de composés phénoliques (donneurs d'électrons) [156,157]. ils sont capables de réduire les radicaux libres comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde, par transfert d'hydrogène ou par la chélation des ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives [158]. D'autres études ont montré que les polyphénols, ainsi que certains dérivés aromatiques comme les monoterpènes, sont des bons inhibiteurs des enzymes responsables de la production des radicaux libres comme : la xanthine oxydase, la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase [159,160,161].

L'analyse statistique montre que l'interaction des variables étudiées (nature de l'antioxydant et les concentrations) avaient un effet significatif sur le pouvoir réducteur. Le test de Newman Keuls [154, 155] a permis de les classer selon leurs pouvoirs réducteurs (appendice H 2.1.2) comme suit:

- Nature des antioxydants BHT > tocophérol > vitamine C (acide ascorbique) > HE du thym > HE de l'origan.

- Les concentrations 1000 > 800 > 600 > 400 > 200 > 100mg/l.

3.6. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne des HE des espèces étudiées

Les résultats acquis relatifs aux diamètres des zones d'inhibition par les HE en utilisant le test de l'aromatogramme sont groupés dans le tableau 3.8 et l'appendice F₃).

L'interprétation des résultats faite par la comparaison avec ceux de l'échelle de mesure citée par Mutai et *al.*, (2009) [96]. En utilisant des antibiotiques comme contrôles positifs.

Souches microbiennes ^a	Source		Diamètre de la zone d'inhibition ^b		
	ATCC	Gram	^c HE <i>Origanum floribundum</i>	^c HE <i>Thymus guyonii</i>	Cp ^d
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	39,67±2,08	46,00 ± 0,00	30,00±1,00
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	35,00±2,00	46,00 ± 2,00	21,33±0,58
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	26,00 ± 1,00	32,33 ± 2,08	31,33±0,58
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	27,00± 1,00	34,66,± 1,53	26,00±1,73
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	44,00 ± 2,64	45,00 ± 1,00	26,33±1,53
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	–	36,00 ± 1,73	26,33 ± 1,53	25,00 ± 1,00
<i>Escherichia coli</i>	4157	–	34,67 ± 1,53	31,00 ± 0,00	28,33±0,58
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	–	46,00 ± 1,00	46,00 ± 2,00	28,67±0,58
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	–	13,33 ± 1,44	22,00 ± 0,00	08,33±0,58
<i>Candida albicans</i>	24433	/	50,67 ± 0,58	64,00 ± 2,00	37,67±1,53
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	/	35,33 ± 0,58	35,00 ± 2,08	30,67±0,58

^aDensité finale bactérienne de 10⁷ à 10⁸ Ufc/ml; ^bDiffusion en mm par disque ± écarts-types avec trois répétitions; ^cHE huile essentielle; ^dCp: contrôle positif Chloramphénicol (30µg/disque) pour les bactéries et Ketoconazole (50µg/disque) pour les levures;

Les résultats ont montré que l'HE d'*Origanum floribundum* et *Thymus guyonii* ont une activité antimicrobienne importante vis-à-vis des souches testées, dépassant largement l'activité des antibiotiques contrôles positifs.

3.6.1. Bactéries Gram⁺

Parmi les bactéries Gram +, le *Staphylococcus aureus* a montré une inhibition de croissance la plus élevée ($44 \pm 2,64$ mm), qui est très fortement inhibitrice selon l'échelle Mutai et al., [96] suivi de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* et *Enterococcus faecium* le plus résistant des Gram⁺ et Chloramphénicol (témoin négatif), avec respectivement $39,67 \pm 2,08$ mm, $35,00 \pm 2,00$ mm, $27,00 \pm 1,00$ mm et $26,00 \pm 1,00$ mm concernant l'HE d'origan (figure 3.50).

L'HE du thym a inhibé très fortement *Bacillus cereus* et *subtilis* avec des zones d'inhibition de $46,00 \pm 2,00$ mm et $46,00 \pm 0,00$ mm [96] respectivement, puis *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium* avec des valeurs $45,00 \pm 1,00$ mm, $34,66 \pm 1,53$ mm, $32,33 \pm 2,08$ mm respectivement (figure 3.50).

Cette constatation nous paraît intéressante surtout que ces bactéries sont pathogènes pour l'homme. Elles sont à l'origine de dangereuses intoxications alimentaires et responsables souvent d'infection nosocomiales, qui constituent un problème majeur de santé publique [117,162,163].

3.6.2. Bactéries Gram⁻

Dans le cas des bactéries Gram⁻, nous remarquons que l'HE de l'origan et thym ont inhibé très fortement la croissance de *Klebsiella pneumoniae* à ($46,00 \pm 1,00$ mm) et ($46,00 \pm 2,00$ mm) respectivement.

Nous avons obtenu l'inhibition de croissance de *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, ($36,00 \pm 1,73$ mm et $34,67 \pm 1,53$ mm) respectivement par l'HE d'origan, puis *Pseudomonas aeruginosa* qui s'est avérée la plus résistante des bactéries Gram négatif et positif montre une zone d'inhibition plus réduite de ($13,33 \pm 1,44$ mm) (légèrement inhibitrice) [96], plus grande que Chloramphénicol de $08,33 \pm 0,58$ mm qui est le témoin négatif.

Concernant l'HE de thym, elle a inhibé *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des halos d'inhibition de ($26,33 \pm 1,53$ mm, $31,00 \pm 0,00$ mm et $22,00 \pm 0,00$ mm) respectivement (fortement inhibitrice) [96] (figure 3.51).

Notons que ces bactéries sont aussi pathogènes pour l'homme lui causant divers troubles métaboliques [164].

3.6.3. Levures

Candida albicans a montré la plus forte sensibilité vis-à-vis de l'HE du thym et d'origan avec des zones d'inhibition de $(64,00 \pm 2,00 \text{mm})$ et $(50,67 \pm 0,58 \text{mm})$ respectivement, supérieure à *Saccharomyces cerevisiae* $(35,33 \pm 0,58 \text{mm})$ et $(35,00 \pm 2,00 \text{mm})$ respectivement et à toutes les bactéries étudiées. Ce résultat nous paraît intéressant du fait que *Candida albicans* cause de nombreuses infections chez l'homme [165] (figure 3.52).

3.6.4. Analyse statistique

Les résultats de l'analyse statistique en analysant les diamètres des zones d'inhibitions comme variables, HE et souches microbiennes comme facteurs, ont mis en évidence un effet significative des HE et des souches microbiennes étudiées sur le diamètre de la zone d'inhibition (test Newman-Keuls et ANOVA 2, $S < 0,05$) [154, 155] (appendice H₁).

Ce test a permis de classer les souches selon leur sensibilité comme suit :

Candida albicans > *Klebsiella pneumoneae* > *Bacillus subtilis* ; *Staphylococcus aureus* > *Bacillus cereus* ; *Saccharomyces* > *Escherichia coli* > *Enterococcus faecium* ; *Micrococcus luteus* ; *Bordetella bronchiseptica* > *Pseudomonas aeruginosa*.

Les HE et témoins positifs sont classés selon leur activité antimicrobienne comme suit:

HE thym > HE origan > Témoin positif

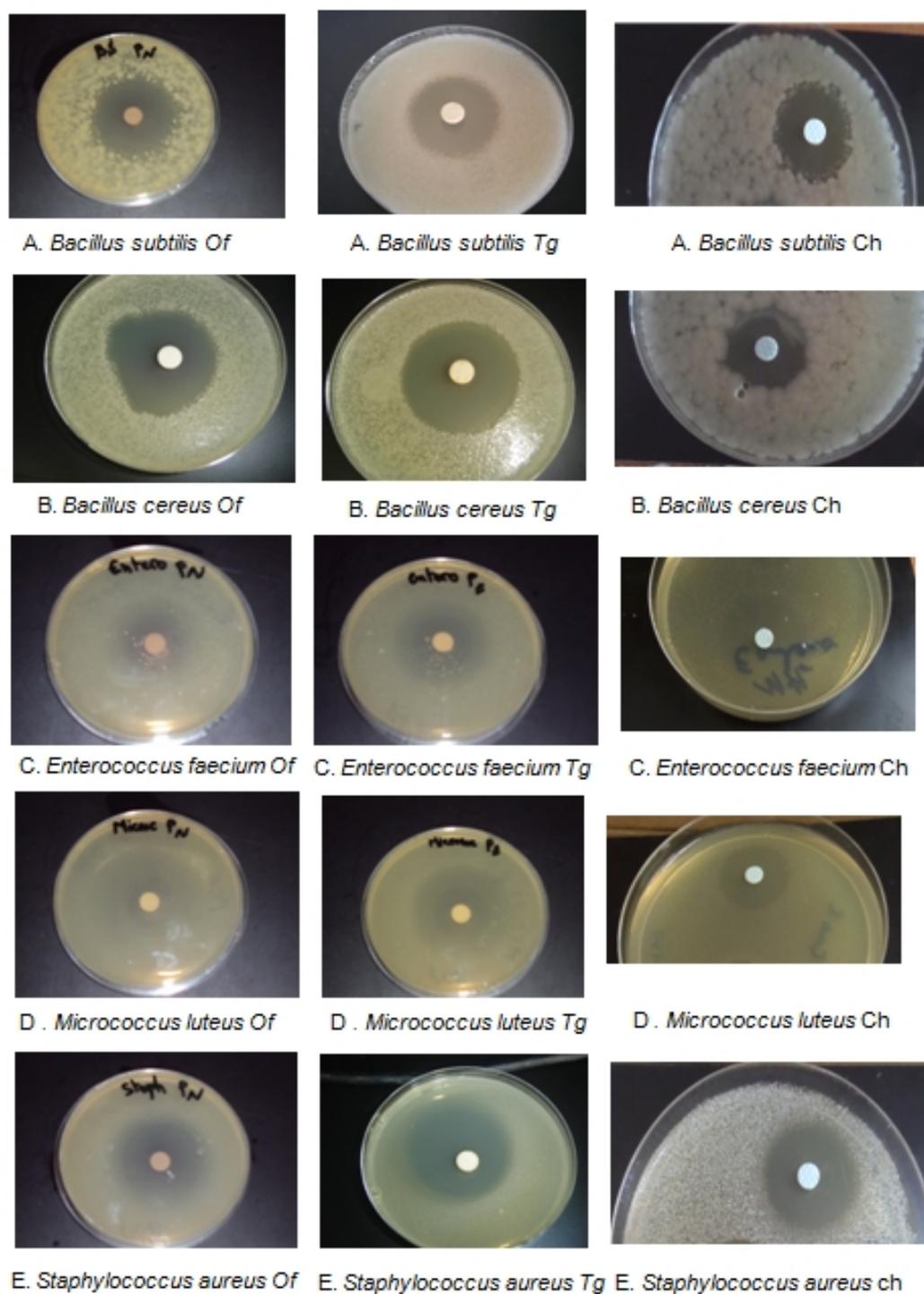
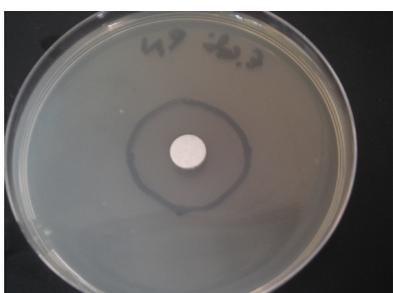
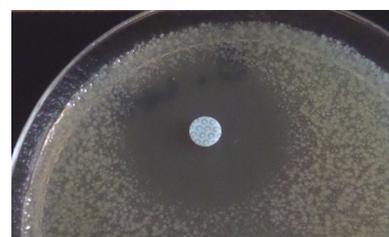
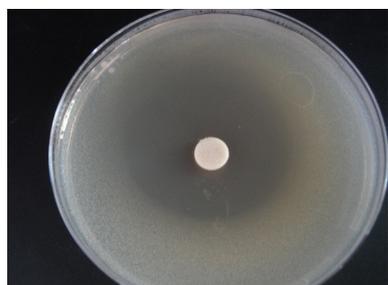
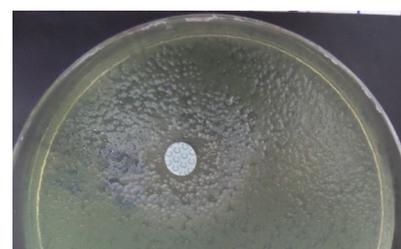


Figure 3.50: Zones d'inhibition de l'HE d'*Origanum floribundum* et *Thymus*

guyonii testées sur des bactéries Gram positifs (A, B, C, D et E)

Of: *Origanum floribundum*. Tg: *Thymus guyonii*. Ch: Chloramphénicol (originale, 2014).

A' *Bordetella bronchiseptica* OfA' *Bordetella bronchiseptica* TgA' *Bordetella bronchiseptica* ChB' *Escherichia coli* OfB' *Escherichia coli* TgB' *Escherichia coli* ChC' *Klebsiella pneumoniae* OfC' *Klebsiella pneumoniae* TgC' *Klebsiella pneumoniae* ChD' *Pseudomonas aeruginosa* OfD' *Pseudomonas aeruginosa* TgD' *Pseudomonas aeruginosa* ChFigure 3.51: Zones d'inhibitions de l'HE d'*Origanum floribundum* et *Thymus guyonii*

testées sur des bactéries Gram négatifs (A', B', C'et D') (originale, 2014).

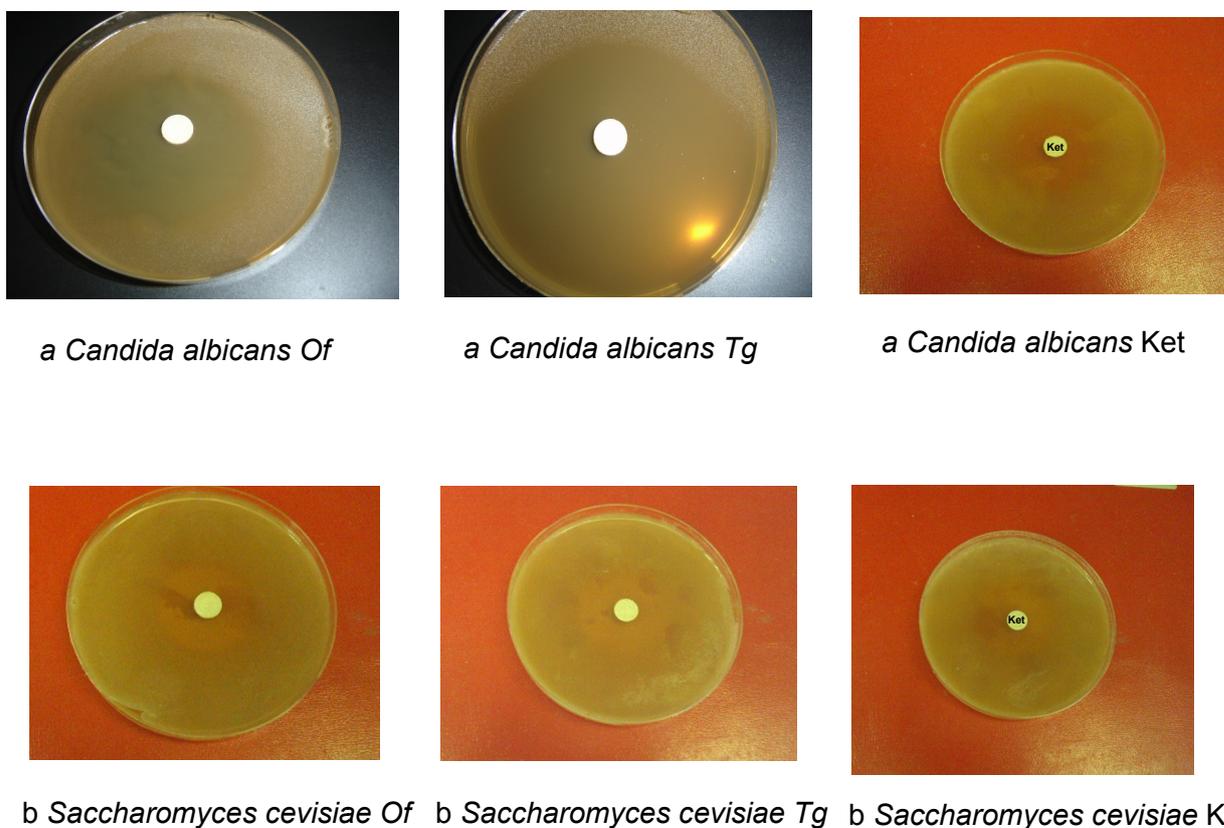


Figure 3.52 : Zones d'inhibitions de l'HE d'*Origanum floribundum*, *Thymus guyonii* et Ketoconazole (Ket) testées sur levures : a : *Candida albicans* et b : *Saccharomyces cerevisiae*

(originale, 2014).

Nous avons remarqué que toutes les souches microbiennes ont montré un degré important de sensibilité aux l'HE étudiées.

Ces HE d'origan et de thym naturels, à large spectre et ne provoquant pas de résistance, peuvent être recommandées pour traiter certaines maladies, parmi elles infection broncho-pulmonaire, catarrhe bronchique, troubles digestifs, gastro-entérite et toxi-infection alimentaires [166, 167, 168, 169, 170, 171, 172].

Les résultats obtenus ne sont pas entièrement similaires à ceux mentionnés dans la littérature [33,173,174,175]. Ceci est due aux problèmes rencontrés notamment :

- Nature du matériel végétal (l'espèce, l'extrait ou l'HE, origine géographique, altitude, saison de cueillette) [173].
- Méthode d'extraction.
- Niveau de pureté du produit final et sa conservation [174].
- Nature des souches étudiées.
- Procédés utilisés pour estimer l'activité antimicrobienne [175].
- Milieux de culture utilisés (milieu synthétique ou naturel) [176].

En effet, Billerbeck et *al.*, et Sivropoulou et *al.*, ont signalé que les bactéries Gram⁻ se sont montrées plus résistantes aux HE que les bactéries Gram⁺ [177, 178]. D'autres auteurs ont remarqué que les bactéries Gram⁻ sont généralement les plus sensibles à l'action des HE [179, 91] [.

La résistance des bactéries Gram⁻ à l'action des HE serait expliquée par la présence d'une seconde membrane qui est composée de lipopolysaccharides (LPS), qui aménage une barrière vis-à-vis des HE ayant une caractéristique hydrophobe [180,181,182,183,184,185].

Les résultats obtenus lors de nos expérimentations concordent avec les travaux des chercheurs (Deans et *al.*, Belgin et *al.*) [186,187], où ils ne mentionnent aucune différence significative entre la sensibilité des bactéries Gram⁻ et celle des bactéries Gram⁺. En effet, les différentes bactéries Gram⁺ et Gram⁻ étudiées manifestent une action variable à l'égard des HE employées puisque *Klebsiella pneumoniae* (Gram⁻) a montré le plus grand halo d'inhibition par rapport à toutes les bactéries. *Bordetella bronchiseptica* et *Escherichia coli* qui sont des bactéries Gram⁻ ont montré une sensibilité plus grande avec des zones d'inhibition de (36,00 ± 1,73 mm et 24,67 ± 1,53 mm) respectivement, par rapport à celles de *Enterococcus faecium* et *Micrococcus luteus* (26,00 ± 1,00 mm et 27,00 ± 1,00 mm) respectivement qui sont des bactéries Gram⁺.

En ce qui concerne l'HE de thym, qui a fortement inhibé la croissance de *Klebsiella pneumoniae* (Gram⁻), ainsi que *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* (Gram⁺) avec presque une même zone d'inhibition de 46,00 mm.

La forte sensibilité de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de l'HE de l'origan et du thym, importante parmi les bactéries a été déjà rapportée par Sari et *al.*, [188] et Chikhouné [93].

Pseudomonas aeruginosa mentionnée par plusieurs auteurs, comme étant très résistante à toute source antimicrobienne et antibiotique [166], s'est révélée sensible à l'action d'HE d'*Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii*, malgré qu'il s'agisse des plus faibles zones d'inhibitions ($13,33 \pm 1,44$ mm) et ($22,00 \pm 0,00$ mm) respectivement. Ces résultats sont à prendre en considération même si ils sont faibles par rapport aux autres résultats obtenus.

La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* est liée à sa capacité d'établir une disposition complexe, constituée de strates distinctes formant un biofilm. Il a été mentionné que le traitement de telles bactéries nécessiterait de grandes concentrations d'agents antimicrobiens [189,190,191].

Plusieurs chercheurs ont prouvé que ce sont les composés phénoliques qui attribuent aux HE une activité antimicrobienne puissante, comme le thymol, le carvacrol, le carvacrol méthyl-ether et leurs précurseurs biogénétiques qui sont γ terpinène et p-cymène [44, 187].

La nature très hydrophobe du carvacrol et son accumulation au niveau de la membrane plasmique de *Bacillus cereus* (Gram⁺), expliquerait son effet puissant envers la bactérie. Le carvacrol va agir comme échangeur de protons réduisant le pH puis la force motrice de protons (potentiel membranaire) avec diminution de production d'adénosine triphosphate (ATP) ce qui conduit à la mort cellulaire [192,193, 194].

Les bactéries Gram⁻ sont aussi détruites par le carvacrol, par désintégration de la membrane externe libérant les LPS et élévation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'ATP, ce qui endommage les cellules de manière irréversible [187,195, 196,197].

Il a été découvert que le p-cymène est le précurseur du carvacrol n'a pas d'effet antibactérien quand il est utilisé seul, mais une fois présent avec le carvacrol, il engendre une synergie entre leurs actions. Le p-cymène facilite le transport du carvacrol dans la cellule microbienne par augmentation du volume membranaire entraînant ainsi sa déstabilisation [192,195].

Comme son isomère (carvacrol), le thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles il incite des fuites d'ions du potassium K⁺. Par contre il n'est pas très actif sur *Pseudomonas aeruginosa* [198,199,200,201,202].

Certains chercheurs ont signalé une activité antimicrobienne synergique entre carvacrol et thymol [203,204,205].

La majorité des travaux étudiés ont eu pour but l'analyse du mécanisme d'action des composés phénoliques (thymol et carvacrol) et montrent que leur primordial site d'action est non seulement la paroi cellulaire et membrane démolissant ainsi sa perméabilité et la libération des constituants intracellulaires (ribose, glutamate, Na et les ions). Les composés phénoliques vont aussi modifier la fonction de la membrane comme transport des ions, l'absorption des nutriments, protéines, synthèse des acides nucléiques et activité enzymatique. Cette activité va induire la mort cellulaire très courante chez *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* [206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213].

Le pouvoir antimicrobien des HE est en rapport directe avec plusieurs variables à savoir :

- La nature des composants majoritaires.
- Concentration de ces composés.
- Nature et structure des groupements fonctionnels.
- L'interaction possible entre les différents constituants (synergie) [214, 215].

3.7. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne

Les valeurs des CMI et CMB/CMF de l'HE d'*Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii* vis-à-vis des souches microbiennes testées ont été faites en deux répétitions et représentées dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9: Valeurs CMI et CMB / CMF d'HE des espèces étudiées vis à vis des souches microbiennes testées.

Souches	ATCC	Gram	HE d' <i>Origanum floribundum</i>		HE de <i>Thymus guyonii</i>	
			CMI(%)	CMB ou CMF(%)	CMI(%)	CMB ou CMF(%)
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	0,125	0,5	0,06	0,125
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	0,25	1,00	0,06	0,06
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	0,5	0,5	0,125	0,125
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	0,5	1,00	0,125	0,125
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	0,06	0,125	0,06	0,125
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	–	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>Escherichia coli</i>	4157	–	0,25	0,25	0,125	0,125
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	4352	–	0,06	0,25	0,06	0,125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	–	1,00	1,00	0,25	0,5
<i>Candida albicans</i>	24433		0,03	0,06	0,03	0,06
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601		0,25	1,00	0,125	0,125

L'HE d'*Origanum floribundum* a effectué une importante activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries et levures testées. Toutes les souches se sont inhibées à des concentrations entre 0,03% et 1% (v/v) par l'HE d'origan et entre 0,25 % et 0,03 % (v/v) par l'HE du thym. L'activité la plus élevée est celle de *Pseudomonas aeruginosa* (1,00 %), (0,25 %) la plus faible est celle de *Candida albicans* (0,03 %) par l'HE d'origan et du thym (Tableau 3.9). Ce qui correspond aux zones d'inhibition car les CMI sont inversement proportionnelles aux diamètres des zones d'inhibitions [206, 216, 217].

Les subcultures effectuées suite à l'acquisition des CMI, ont permis d'observer les concentrations minimales bactéricides (CMB) sur les 9 bactéries et les concentrations minimales fongicides (CMF) sur les deux levures testées.

La concentration minimale bactéricide et/ou fongicide est souvent égale ou plus élevée que la CMI [218, 219, 220, 221, 222]. Sur toutes les bactéries étudiées, les valeurs de CMB sont superposables chez *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Enterococcus faecium* et *Pseudomonas aeruginosa* pour l'HE d'origan. Pour le cas de l'HE du thym, les CMB et CMI sont similaires chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium* et *Bacillus cereus*. En revanche pour l'HE d'origan, il faut au moins le double de la CMI pour obtenir l'effet fongicide sur *Candida albicans*, bactéricide sur *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*. Dans le cas de l'HE de thym, il faudrait le double de CMI pour avoir l'effet fongicide sur *Candida albicans* et bactéricide sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiela pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*.

Il est demandé quatre fois la CMI pour obtenir l'effet bactéricide sur *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, et *Klebsiela pneumoniae* pour l'HE d'origan. Même résultat sur l'effet fongicide de l'HE d'origan sur *Saccharomyces cerevisiae*.

Les valeurs les plus élevées des CMB/CMF de l'HE d'origan enregistrées à 1% (v/v) sont enregistrées chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* et *Bacillus cereus*. Quand aux valeurs les plus faibles, qui sont à 0,06 % (v/v) sont obtenues chez *Candida albicans* pour l'HE d'origan. Pour l'HE du thym, les valeurs CMB/CMF, les plus élevées (0,5 % v/v) sont celles de *Pseudomonas aeruginosa*. Les plus faibles, sont celles de *Candida albicans* et *Bacillus cereus*.

Malgré les changements des CMI et CMB ou CMF d'un microorganisme à un autre, dans certains cas, elles sont égales indiquant ainsi une forte action bactéricide et fongicide. En effet, quand le rapport CMB/CMI (CMF/CMI) est supérieure ou égal à 4, l'HE est dite bactériostatique ou fongistatique. Par contre, lorsque le rapport CMB/CMI (CMF/CMI) étant inférieure à 4, l'HE est dite bactéricide ou fongicide [223, 224, 225].

Le tableau 3.10 indique les différents rapports CMB/CMI, CMF/CMI.

Tableau 3.10 : Rapport CMB/CMI, CMF/CMI de d'HE des espèces testées vis-à-vis des souches bactériennes et des levures.

Souches	Activité de l'HE d'origan		Activité de l'HE du thym	
	CMB/CMI ou CMF/CMI	Interprétation	CMB/CMI ou CMF/CMI	Interprétation
<i>Bacillus subtilis</i>	4,00	Bactériostatique	2,08	Bactéricide
<i>Bacillus cereus</i>	4,00	Bactériostatique	1,00	Bactéricide
<i>Enterococcus faecium</i>	1,00	Bactéricide	1,00	Bactéricide
<i>Micrococcus luteus</i>	2,00	Bactéricide	1,00	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,08	Bactéricide	2,08	Bactéricide
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1,00	Bactéricide	1,00	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	1,00	Bactéricide	1,00	Bactéricide
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4,17	Bactériostatique	2,08	Bactéricide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,00	Bactéricide	2,00	Bactéricide
<i>Candida albicans</i>	2,00	Fongicide	2,00	Fongicide
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,00	Fongistatique	1,00	Fongicide

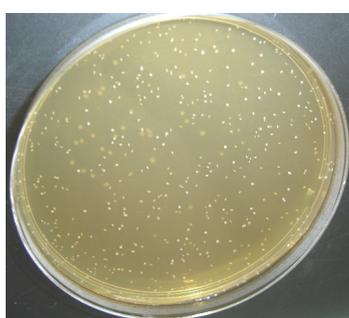
Le tableau 3.10 montre que l'HE d'origan testée a un pouvoir bactéricide sur six bactéries parmi les neuf testées et un pouvoir fongicide sur les deux levures testées. Par contre l'HE du thym a un pouvoir bactéricide sur toutes les bactéries et fongicide sur les deux levures testées. Nous pouvons dire que l'HE du *Thymus guyonii* a révélé, à la fois une bonne activité bactéricide et fongicide meilleure que l'HE d'*Origanum floribundum*. Ces activités favorisent l'application des huiles essentielles testées aux produits pharmaceutiques.

L'importante action antimicrobienne démontrée par l'HE du thym est en relation avec sa forte teneur en thymol. L'origan, a une huile présentant une teneur en p-cymène, thymol et carvacrol très élevée.

Ces composés phénoliques sont connus pour avoir une haute action antimicrobienne et sont considérés comme les composés chimiques purs. Les

plus efficaces et les plus larges d'action sont les phénols à forte concentration. Ils sont responsables d'une action bactéricide rapide car ils traversent la paroi bactérienne et dénaturent les protéines. A faible concentration ils sont bactériostatiques [189]. Les phénols sont suivis par les monoterpènes (pinènes et limonènes) [195].

Le dénombrement de *Candida albicans* et d'*Escherichia coli* respectivement après 48h et 24h d'incubation, nous ont permis de comptabiliser les colonies acquises à l'aide d'un compteur de colonies. La figure 3.53, nous montre la photographie des colonies obtenues des souches testées.



Escherichia coli (après 24h)



Candida albicans (après 48h)

Figure 3.53 : Dénombrement des colonies obtenues de la souche *Candida albicans* après 48 h d'incubation et d'*Escherichia coli* après 24h d'incubation

(originale, 2014)

Nous avons pu compter 318 colonies pour *Escherichia coli* et 390 colonies pour *Candida albicans* dans la dilution 10^{-6} .

En appliquant la formule suivante :

$$X = N \times 1/v \times 1/d$$

où

X : concentration microbienne de la suspension mère.

N : nombre de colonies.

v : volume de la prise d'essai (déposé sur la boîte de pétri).

d : dilution de la suspension microbienne

Pour *Escherichia coli* on a $X = 318 \times 1/1 \times 1/10^{-6} = 3,18 \times 10^8$ UFC/ml.

Pour *Candida albicans* $X = 390 \times 1/1 \times 1/10^{-6} = 3,90 \times 10^8$ UFC/ml.

Ce qui nous affirme les concentrations de la suspension mère prise au départ, conformes aux normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) [94].

3.8. Préparations et contrôle physico-chimique des pommades dermiques

Nous avons préparé des pommades dermiques à base d'HE d'*Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii* aux concentrations 0,5% et 1% (figure 3.54) en respectant les règles de BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication de médicaments) [99, 104].



Pommade jaunâtre,
homogène et lisse

Figure 3.54 : Pommade dermique à base d'HE d'origan
(originale, 2014).

Nous avons utilisé des ingrédients répertoriés dans le « Handbook of pharmaceutical Excipients » [102].

Nous avons introduit les HE des plantes étudiées dans des pommades en usage topique dans le but de mettre en évidence de nouvelles formes thérapeutiques et de valoriser la flore Algérienne riche en principes actifs en dermatopharmacie.

La combinaison de lanoline avec la vaseline est très utilisée dans la composition de formules magistrales et officinales. Le premier composé permet à l'excipient de devenir hydrophile, de lui apporter des propriétés adoucissantes et une meilleure pénétration cutanée [103].

3.8.1. Détermination des caractères organoleptiques

La formulation galénique acquise est sous forme de pommade de couleur jaunâtre, lisse, rigide, et d'aspect brillant. Elle a une odeur agréable (odeur

d'origan ou de thym léger). Elle est douce à l'application, ne colle pas et se résorbe par la peau.

3.8.2. Contrôle de l'homogénéité

Nous avons observé la pommade étalée entre lame et lamelle au microscope photonique (Gr x 10 x 10) (figure 3.55), aucune présence de grumeaux n'a été décelée, donc la pommade est parfaitement homogène.

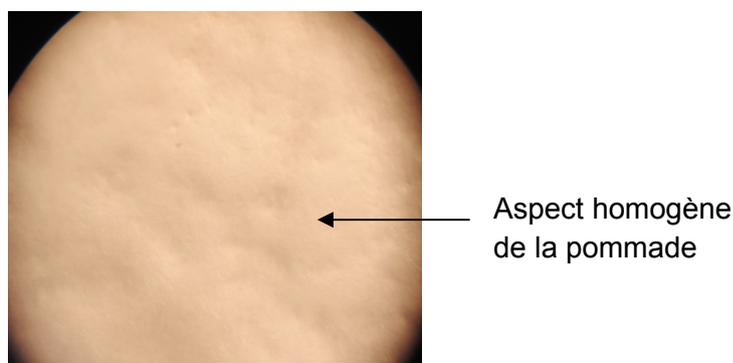


Figure 3.55 : Observation de la pommade dermique au microscope photonique (test d'homogénéité, Gr x 10 x 10)

(originale, 2014).

3.8.3. Evaluation de la stabilité et vieillissement accéléré

La centrifugation à vitesse constante (4500 tours/min) n'a montré aucun phénomène d'instabilité. Le test de stabilité et la résistance de la pommade est appréciable.

3.8.4. pH des pommades dermiques

L'intervalle de pH des préparations s'échelonne entre 6,5 et 8. Il est à mentionner que le pH de la peau est d'environ 5,5 d'où l'exigence d'obtenir un pH neutre ou légèrement acide. Le pH de la pommade que nous avons préparé est de 6.

3.8.5. Contrôle de la qualité microbienne des pommades dermiques obtenues

Les résultats du contrôle de la qualité microbienne des pommades dermiques sont cités dans le tableau 3.11.

Tableau 3.11 : Contrôle microbiologique des pommades dermiques.

Germes recherchés	Pommade à base d'HE d'origan	Pommade à base d'HE du thym	Normes (Ph Eur)
	UFC/g	UFC/g	UFC/g
Germes mésophiles : levures et moisissures	00	00	< 100
Germes mésophiles : bactéries	00	00	< 300
Entérobactéries	00	00	< 10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	00	00
<i>Staphylococcus aureus</i>	00	00	00
<i>Escherichia coli</i>	00	00	00

Ph Eur: Pharmacopée Européenne.

Les résultats de vérification de la qualité microbiologique des pommades étudiées nous ont permis de montrer :

- ✓ Absence de germes viables totaux (mésophiles et champignons).
- ✓ Absence d'entérobactéries.
- ✓ Absence d'*Escherichia coli*.
- ✓ Absence de *Staphylococcus aureus*.
- ✓ Absence de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats ont montré un taux de contamination bactérienne et fongique nulle et ont permis aussi de montrer l'absence totale de germes pathogènes (Appendice G).

Selon les normes de Pharmacopée Européenne [106], les ensembles des pommades étudiées sont exempts de toutes contaminations microbiennes, ils sont alors déclarés conformes et propres à l'utilisation.

La protection microbiologique des pommades est obtenue en utilisant des conservateurs adaptés (HE d'origan et HE du thym) à la formulation.

3.9. Essais pharmaco-toxicologiques

Pour analyser l'indice d'irritation primaire cutanée et l'activité cicatrisante nous avons suivi les étapes suivantes :

3.9.1. Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée (IPC) de l'HE

La réaction cutanée érythème et œdème est estimée et mesurée sur les zones d'essais et de témoins (Figures 3.56, 3.57 et 3.58) [107].

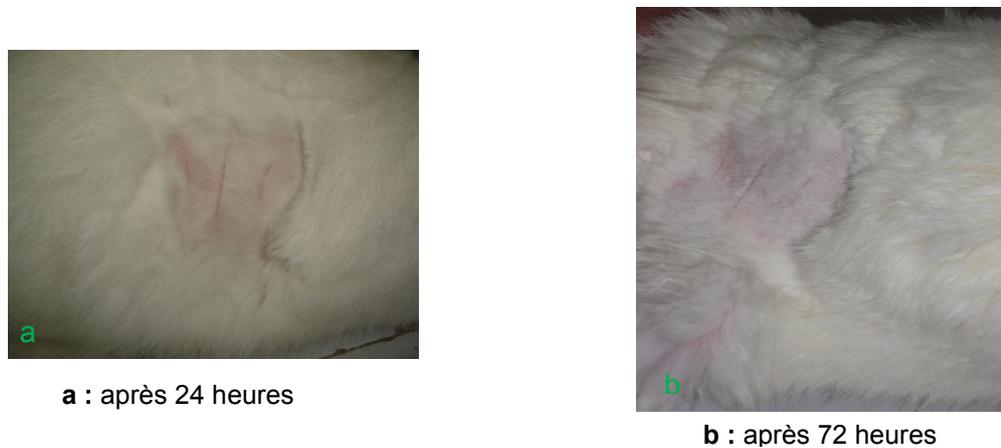


Figure 3.56 : Flancs de lapins témoins après scarification et sans traitement



Figure 3.57 : Flancs de lapins testés, après scarification et application de la pommade à base d'HE d'*Origanum floribundum*

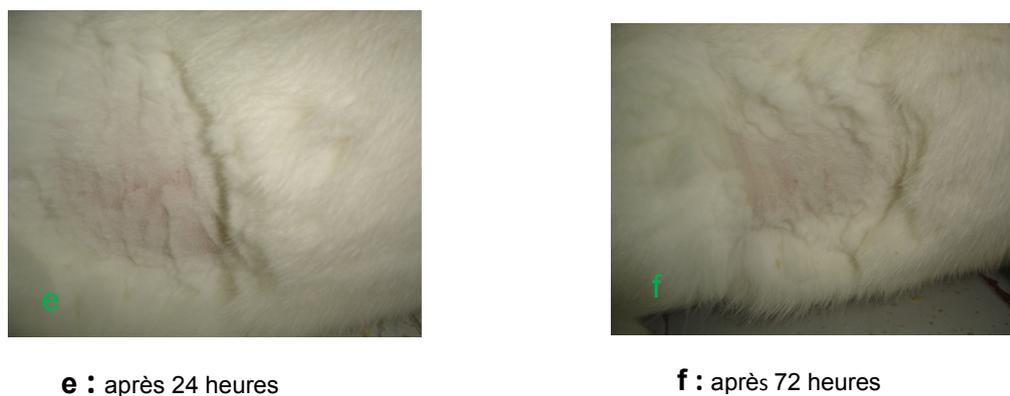


Figure 3.58 : Flancs de lapins testés, après scarification et application de la pommade à base d'HE de *Thymus guyonii* (originale, 2014).

Les résultats de l'appréciation de l'irritation cutanée primaire chez les lapins traités et témoins de l'expérimentation sont représentés dans le tableau 3.12.

Tableau 3.12 : Estimation de l'indice d'irritation cutanée primaire chez des lapins traités par la pommade d'HE des deux espèces.

N° de lapin	Flanc traité Pom HE Of				Flanc traité Pom HE Tg				Flanc témoin sans trait			
	Œdème		Erythème		Œdème		Erythème		Œdème		Erythème	
	J1(2 4h)	J3(7 2h)	J1(2 4h)	J3(7 2h)	J1(2 4h)	J3(7 2h)	J1(2 4h)	J3(7 2h)	J1(2 4h)	J3(7 2h)	J1(2 4h)	J3(7 2h)
1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
4	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Pom: Pommade; HE Of: huile essentielle d'*origanum floribundum*; Tg: *Thymus guyonii*; trait: traitement.

Les résultats obtenus présentent uniquement de légers érythèmes au cours de la première observation (24h), qui s'estompent après 72h. Notons qu'il y'a une absence totale d'œdèmes durant toutes les expériences.

Tableau 3.13 : Appréciation des réactions cutanées.

N° de lapin	Œdème + érythèmes 24h + 72h Flanc traité Pom HE Of	Œdème + érythèmes 24h + 72h Flanc traité Pom HE Tg	Oedème +érythèmes 24h + 72h Flanc témoin
1	1	0	1
2	0	1	0
3	1	0	1
4	1	1	0
5	0	1	0
6	1	0	0
Valeurs cumulées	4	3	2

Pour ranger notre produit, nous avons calculé l'indice d'irritation primaire cutanée (IP) à partir des valeurs (du tableau 3.13) et de l'équation suivante :

$$IP = (\text{Œdème} + \text{Erythème})_{\text{Flanc traité}} + (\text{Œdème} + \text{Erythème})_{\text{Flanc témoin}} / 24$$

24 = nombre de lapins (6) x nombre de zones testées (traité et témoin = 2) x nombre de type d'irritation (œdème et érythème = 2) [107, 226, 227, 228, 229].

Nous concluons que pour:

- Pommade à base HE d'*Origanum floribundum* $IP = 4 + 2 / 24 = 0,25$
- Pommade à base HE de *Thymus guyonii* $IP = 3 + 2 / 24 = 0,21$

Les résultats acquis montrent que les indices d'irritations primaires de l'origan et thym, sont de 0,25 et 0,21 inférieures à 0,5. Ce qui nous amène à déduire que les pommades d'HE d'origan et de thym sont non irritantes pour la peau et peuvent être utilisées pour les traitements topiques.

3.9.2. Analyse de la cicatrisation de plaies in vivo des pommades dermiques

Les résultats des cotations numériques qui correspondent aux paramètres suivants : œdème, bourgeonnement et épaisseur de la croûte sont cités dans le tableau 3.14 selon les estimations de Pourrat [108].

Tableau 3.14 : Estimation des paramètres de cicatrisation chez le rat, en fonction du temps (jours).

Produits Jours	Paramètres	Aucun trait.	Excipient	Pom. Orig. 0,5%	Pom. Orig 1%	Pom. thym 0,5%	Pom. thym 1%	Madécasol® 1%
0	Œdème	0	0	0	0	0	0	0
	Bourgeon	0	0	0	0	0	0	0
	Croûte	0	0	0	0	0	0	0
2	Œdème	1 – 2	0 – 2	1 – 2	0,5 – 2	1-2	0-1	1 – 2
	Bourgeon	0 – 1	0 – 1	1	1 – 1,75	0-0,5	1	1 – 2,5
	Croûte	1	1	0 – 0,5	0 – 1,5	0-1	1-1,5	0 – 1
6	Œdème	0 – 1	0 – 1	0	0	0	0	0 – 1
	Bourgeon	1 – 2,5	1 – 2	1,5 – 2,5	1 – 2	1-2	1,5-2,5	1 – 2
	Croûte	1	1	1 – 3	1 – 3*	2-3	1,5-2,5	1 – 2*
8	Œdème	0 – 1	0 – 1	0	0	0	0	0
	Bourgeon	2 – 3,5	1 – 2,5	2	1	2-2,5	2	1
	Croûte	1-2*	1,5 – 2*	2 *	1*	2 ^ˆ	1 ^ˆ	3 – 1*
12	Œdème	0	0	0	0	0	0	0
	Bourgeon	2,5	2	1	0	0	0	0
	Croûte	3*	2*	0	0	0	0	0
14	Œdème	0	0	0	0	0	0	0
	Bourgeon	2,5 -3,5	1 – 2,5	0	0	0	0	0
	Croûte	0-1*	0-1*	0	0	0	0	0

* Nouvelle croûte ; Aucun trait : aucun traitement ; Pom. orig: Pommade à base d'huile essentielle d'origan ; Pom thym: Pommade à base d'huile essentielle de thym.

3.9.2.1.Apparition d'un œdème

Nous avons distingué qu'un œdème apparaît dès le lendemain de la lésion dans tous les cas étudiés (figure 3.59). Cet œdème s'atténue pour disparaître au 6^{ème} jour pour les plaies traitées par la pommade d'HE d'origan et du thym, 8^{ème} jour pour celles soignées par Madécasol® (témoin positif). L'œdème persiste

jusqu'au 10^{ème} jour pour les rats traités par l'excipient (placebo) et ceux qui ne sont pas soignés (témoin négatif).

Nous avons remarqué que les plaies traitées avec la pommade d'HE d'origan, du thym ou produit de référence Madécasol®, montrent moins d'inflammations par rapport à celles qui ont reçues des applications d'excipients et celles qui ne sont pas traitées.

3.9.2.2. Existence de bourgeonnement

Le bourgeonnement au niveau des plaies commence dès le 1^{er} jour (figure 3.59), les résultats montrent qu'il est plus grand pour les plaies traitées, avec les pommades testées d'origan et de thym ainsi que le produit de référence le Madécasol®. La pommade à 1% d'HE du thym montre un bourgeon de cotation 1 par estimation de Pourrat [108]. Il est de 1-1,75 pour la pommade à 1% d'HE d'origan, de 1-2,5 pour Madécasol® et de 1 pour la pommade à 0,5% d'HE d'origan et thym.

Ce bourgeonnement s'estompe au 12^{ème} jour. Les plaies traitées avec l'excipient et celles qui ne sont pas traitées persistent jusqu'au 14^{ème} jour avec une estimation allant de 1-2,5 à 2,5-3,5 respectivement.

L'existence d'un bourgeon plus précoce, plus charnu se déclare avec les pommades étudiées et ce quelque soit la concentration utilisée et le produit de référence Madécasol®, signe d'une meilleure cicatrisation.

3.9.2.3. Epaisseur de la croûte et sa régénération

La croûte se formait dès le 2^{ème} jour, plus fine pour les non traités et s'épaissit avec les plaies soignées jusqu'au 6^{ème} jour de façon plus considérable avec la pommade à l'HE d'origan et le produit Madécasol® (2-3 pour la pommade à 0,5% d'HE du thym). Il y'a rénovation de la croûte au 6^{ème} jour chez les plaies soignées par les pommades à 0,5% d'HE du thym, 1% d'HE d'origan et Madécasol®. Ce n'est qu'au 8^{ème} jour que les plaies traitées par la pommade à 0,5% d'HE d'origan, à 1% d'HE du thym et les plaies non traitées régénèrent la croûte.

La cicatrisation parvient à son seuil au 12^{ème} jour au niveau des plaies soignées avec la pommade 0,5, 1% d'HE du thym, 1% d'HE d'origan et le Madécasol®. C'est au 14^{ème} jour que les plaies soignées par la pommade 0,5% d'HE d'origan arrivent au seuil de la cicatrisation (Figure 3.59). Nous remarquons qu'au 18^{ème} jour, les lésions non traitées arrivent à se cicatriser.

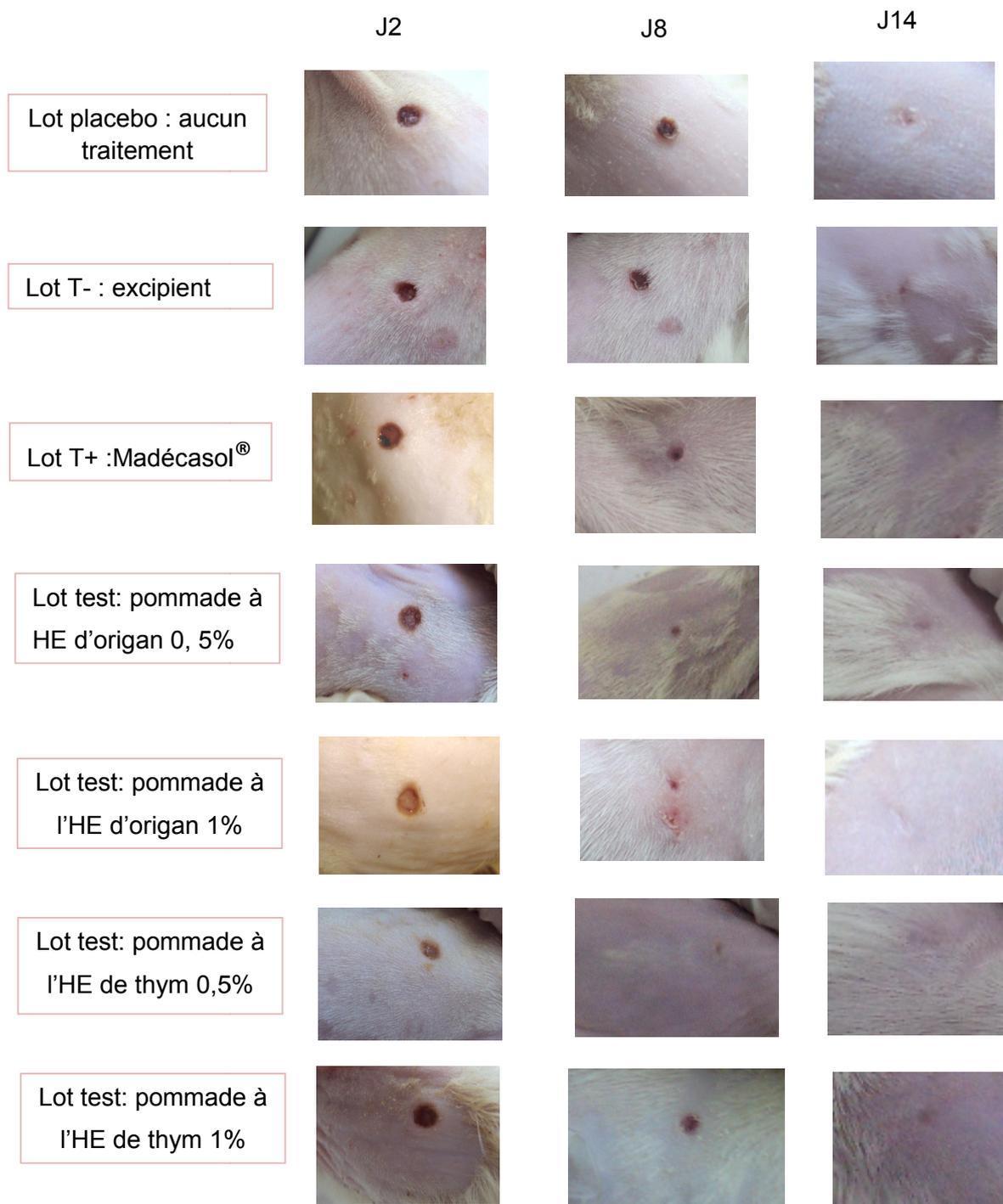


Figure 3.59: Evolution du processus de cicatrisation des plaies profondes circulaires

(originale, 2014).

Nous avons remarqué que la cicatrice du 14^{ème} jour, au niveau des plaies soignées par la pommade étudiée et Madécasol® est très fine, superficielle et peu visible.

Les blessures non traitées présentent un pourtour distinct, perceptible et vêtu d'une croûte qui ne s'est pas encore détachée (Figure 3.59).

3.9.2.4. Surface de la plaie

Nous avons remarqué que la diminution des surfaces des lésions traitées et non traitées se développent avec le temps. Au 14^{ème} jour nous remarquons que cette réduction est plus grande au niveau des plaies traitées par la pommade d'HE d'origan à 1 % avec une surface de 0,43 mm² (lésion presque fermée). La pommade d'HE de thym à 0,5 % a une surface de 0,9 mm², celle de Madécasol® a une surface de 1,37 mm². L'HE du thym à 1 % possède une surface de 1,44 mm², la pommade à base d'huiles essentielle d'origan à 0,5 %, présente une surface de 1,45 mm², comparée à l'excipient avec 1,90 mm², celle du placebo 3,27 mm² qui restent importantes, la cicatrisation est plus lente (Figure 3.60) et (Appendice F₄).

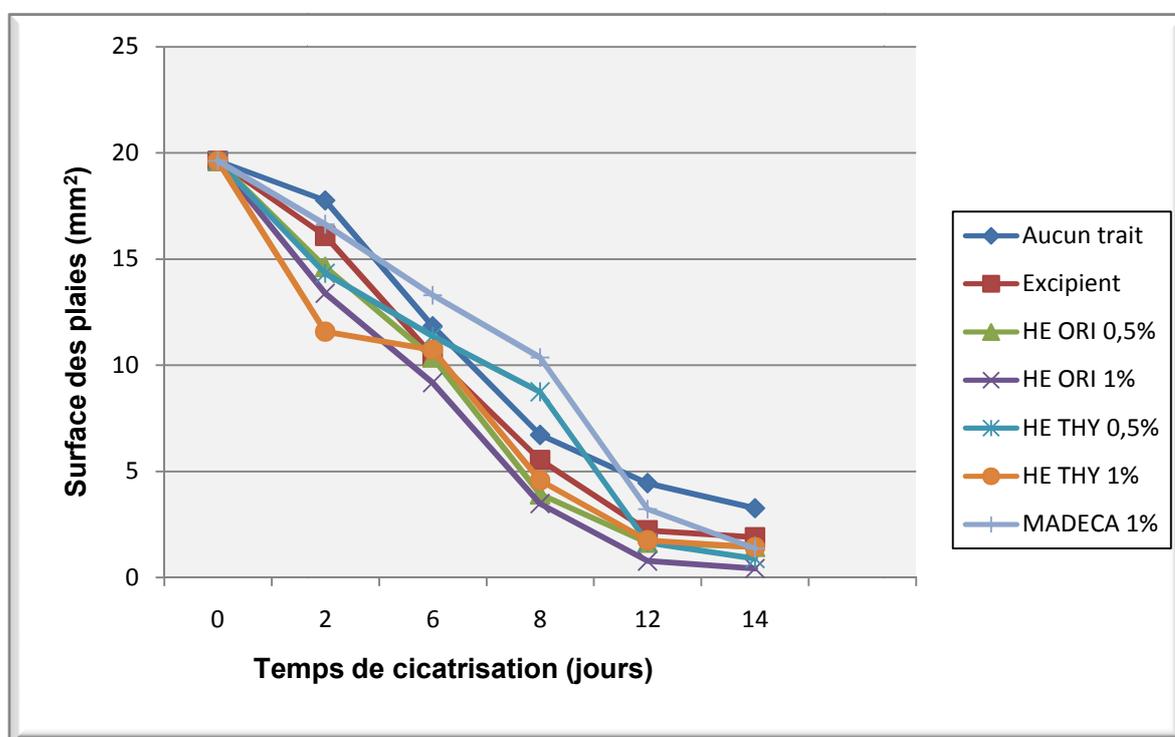
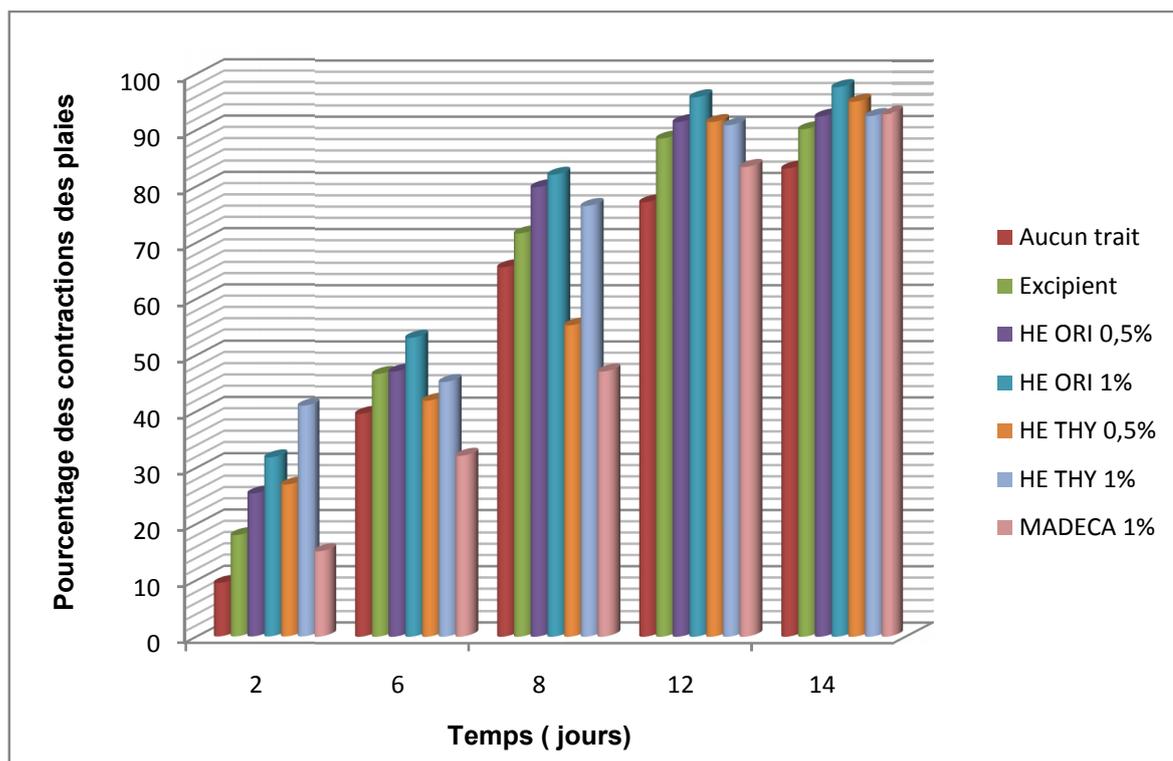


Figure 3.60 : Evolution de la surface de la lésion chez le rat, en fonction du temps.

A partir des surfaces des blessures, le calcul du pourcentage de la contraction des lésions se fait selon la formule suivante [230, 231]:

$$\% \text{ de contraction} = (S_{j0} - S_{jn}) \times 100 / S_{j0}$$

où S_{j0} = surface de la plaie au jour 0
 S_{jn} = surface de la plaie au jour 2, 6, 8, 12 et 14.



Aucun trait : Aucun traitement ; HE ORI :Pommade à HE d'Origan ; MADECA : Madécasol®.

Figure 3.61: Taux des contractions des blessures chez le rat en fonction du temps.

La Figure 3.61 et Appendice F₅ nous montrent les pourcentages de réduction des lésions. Nous remarquons que le lot de rats soigné par la pommade d'HE d'origan à 1 % affiche une réduction de surface assez importante à partir du 14^{ème} jour où nous enregistrons un taux de 97,80% par rapport à la pommade à 0,5 % d'HE du thym, qui montre un taux de 95,21 %.

La pommade de référence Madécasol®, se classe en troisième position avec un taux de 93 %, suivi de la pommade à base d'HE de thym 1 % avec 92,66 % et la pommade d'HE d'origan à 0,5 % avec une valeur de 92,60 %. L'excipient et le placebo se classent en dernière position avec respectivement 90,33 et 83,34 %.

L'analyse statistique (appendice H₃) révèle que l'interaction des variables testées (agent cicatrisant et le temps) n'a pas d'effet significatif sur la contraction de la blessure, notamment la cicatrisation. Le test de Newman et Keuls [153,154] classe ces variables selon leurs capacités de contraction de plaie (appendice H₃) comme suit :

- Agents cicatrisants :

Pommade (P) à 1 % d'HE origan; P à 1 % d'HE thym; P à 0,5 % d'HE d'origan; Madécasol ® 1 %; P à 0,5 % d'HE du thym > excipient > placebo (témoin négatif).

- Période :

14 jours (j) ; 12 j > 8 j > 6 j > 2 j > 0 j.

3.9.2.5. Profondeur de la plaie

L'application de la pommade à base d'HE de thym et d'origan pendant 14 jours a considérablement réduit la profondeur des blessures (figure 3.62). La pommade à 0,5 % d'HE de thym a une profondeur de 0,5mm, la même valeur que celle de la pommade à l'HE 0,5 et 1 % d'origan, suivi de 0,6 mm de l'HE de thym 1 %, puis 0,7 mm profondeur de Madécasol®. Les lésions ont montré des plaies plus profondes allant de 1mm à 2mm respectivement pour l'excipient et le placebo.

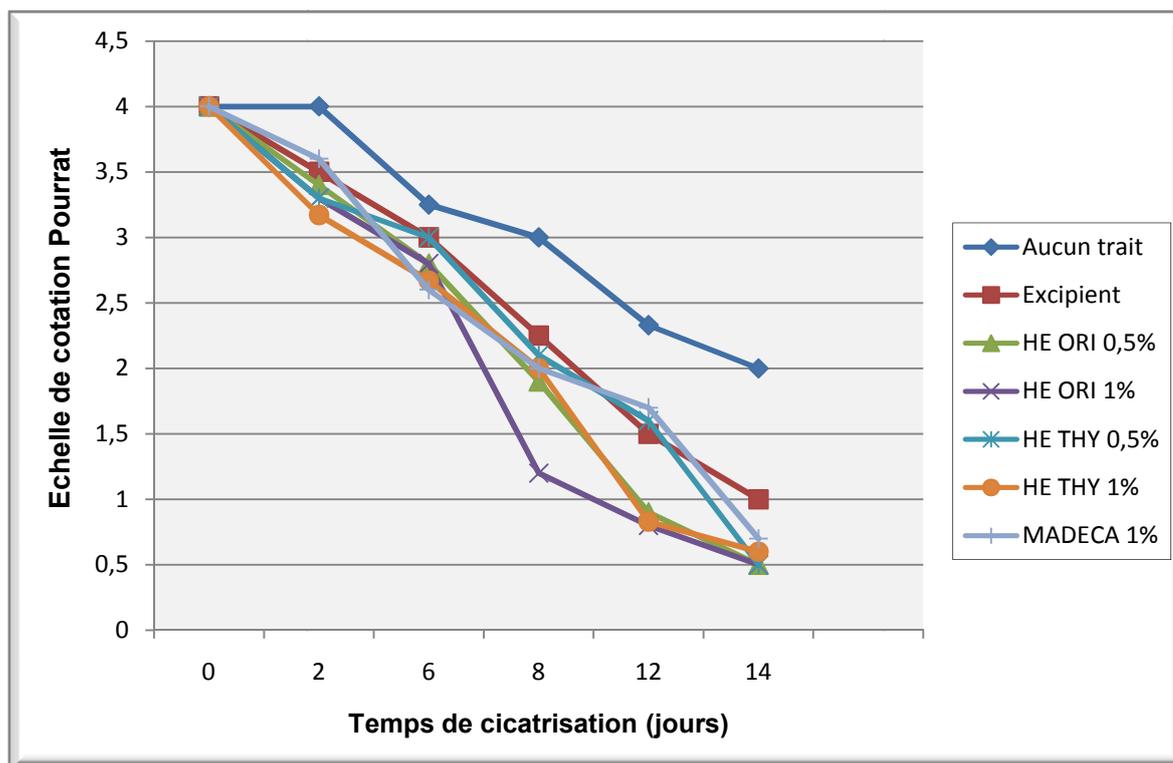


Figure 3.62: Evaluation de la profondeur de la lésion chez le rat en fonction du temps.

Suite aux résultats obtenus par l'étude de l'activité cicatrisante, nous pouvons déduire éventuellement que les pommades à base d'HE de thym et d'origan ont un bon pouvoir cicatrisant. Elles sont capables d'activer la progression de la cicatrisation des blessures et plaies et d'améliorer leur guérison à partir de 0,5 % d'HE incorporé à la formulation de la pommade dermique. Au-delà de cette concentration, la pommade a donné de meilleurs résultats que la pommade de référence le Madécasol®.

Nous avons remarqué que l'emploi de l'excipient seul montre un petit effet cicatrisant par rapport au placebo, d'où son importance comme véhicule des principes actifs introduits dans la pommade.

Les données de notre étude obtenues montrent que les HE de *Thymus guyonii* et d'*Origanum floribundum* possèdent plusieurs activités biologiques notamment

l'activité cicatrisante, activité antimicrobienne à large spectre et activité antioxydante.

Nous pouvons déduire que les HE de thym et d'origan sont munies de propriétés médicinales.

Il a été signalé dans la littérature [232,233], que les HE du thym et origan ont des propriétés d'appoint adoucissants et antiprurigineux des affections dermatologiques, comme trophiques protecteurs dans le traitement des crevasses, écorchures, gerçures et contre les piqûres d'insectes. Les HE de thym et d'origan ont les propriétés de soulager les douleurs musculaires, rhumatismales, les enflures, les blessures externes, toutes sortes d'irritations, désinfection des plaies et soin des mycoses cutanées [48].

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

Les produits naturels issus des plantes notamment les huiles essentielles représentant une importante source de molécules pouvant être exploitées dans différents domaines, en l'occurrence la phytothérapie.

Au terme de ce travail consacré d'une part à l'étude botanique des 2 espèces *Thymus guyonii* (thym) et *Origanum floribundum* (origan) et d'autre part tester les activités biologiques des HE.

L'étude approfondie de *Thymus guyonii* et *Origanum floribundum*, espèces de la famille des Lamiaceae qui poussent spontanément dans les hautes montagnes nous a confirmé la localisation des organes sécréteurs des HE.

Les observations des coupes anatomiques de la feuille, tige et pétiole de l'espèce étudiée à main levée et au microtome puis observées au microscope photonique ont révélé la présence de poils tecteurs et de poils sécréteurs (trichomes glandulaires). Ils sont localisés en surface des épidermes des organes végétatifs et reproducteurs de *Thymus guyonii* et *Origanum floribundum*, leur richesse sur les feuilles et les fleurs est nettement élevée.

Le rendement en HE obtenu par hydrodistillation à l'échelle semi-pilote de l'HE d'origan est de $2,6 \pm 0,1\%$. Celui du thym est de $0,98 \pm 0,01\%$. La cinétique d'extraction des HE d'origan à l'échelle du laboratoire, nous a permis de déduire qu'après 2h d'extraction, la totalité de l'HE d'origan et 1h l'HE du thym emmagasinées au niveau des trichomes glandulaires est obtenue.

Les variables physico-chimiques (indice d'acide, indice d'ester, densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire et miscibilité à l'éthanol) nous ont permis de montrer que les HE du thym et d'origan se conservent bien et peuvent favoriser leur emploi dans les produits cosmétiques.

La caractérisation des HE par CG/SM, nous a permis d'identifier 60 composants représentant 98,2% de la composition totale de l'HE de *Thymus guyonii*. Le thymol est le composé majoritaire (monoterpène oxygéné) avec une

teneur de **35,8%**, suivi du α -terpinène à 18,7%, du p-cymène à 15,5%, du thymol methyl ether à 15,2%, du linalool à 4% et carvacrol à 2,2%.

La caractérisation de l'HE d'*Origanum floribundum* par CG/SM, quand à elle a révélé l'existence de 27 molécules qui représentent 99,8% de la composition totale. Le chémotype est le p-cymène à **53,4%**, suivi du thymol à 27,8%, du carvarol à 8,4%, du carvacrol methyl ether à 3,9% et α -terpinène à 1,1%.

L'activité antioxydante au DPPH de l'HE, du BHT et tocopherol révèle que l'HE d'organ présente une capacité de réduction du radical DPPH plus élevée que celle du thym, comparable à celles du tocophérol et BHT à partir des concentrations 600 mg/l.

Cette activité antioxydante des HE peut être attribuée à sa teneur en thymol avec précurseurs biogénétiques qui agissent en synergie. Ces composés phénoliques sont capables de piéger les radicaux libres grâce aux groupements hydroxyles dans sa structure chimique.

L'HE d'*Origanum floribundum* montre un bon pouvoir réducteur, qui est proportionnel à la concentration des essais et témoins. Il est légèrement inférieur en comparaison avec ceux de l'acide ascorbique, du BHT et du tocophérol.

L'HE de *Thymus guyonii* a montré des valeurs inférieures aux antioxydants de référence. Mais à partir de la concentration 400mg/l, il a donné des valeurs plus élevées que l'acide ascorbique.

Les HE étudiées ont une activité antioxydante considérable, permettant de prévenir le stress oxydatif qui altère et détruit les cellules. Elles peuvent être utilisées dans l'alimentation comme apport additionnel de composés antioxydants en complément à l'acide ascorbique (vitamine C) et α -tocophérol (vitamine E).

Les recherches sur les oxyradicaux et les antioxydants sont précisément d'actualité car de nombreux mécanismes bioradicalaires demeurent à être déterminés aussi bien in vitro qu'in vivo.

Les tests de l'activité antimicrobienne réalisés montrent que les HE possèdent un large spectre d'action vis-à-vis de tous les microorganismes. Il n'y'a pas de distinction significative entre la sensibilité des bactéries Gram⁻ et celle de Gram⁺.

Les composés phénoliques attribuent aux HE de thym et d'origan une forte activité antimicrobienne comme le thymol, carvacrol, carvacrol méthyl-ether et leurs précurseurs biogénétiques qui sont p-cymène et γ -terpinène qui engendrent une synergie entre leurs faits, qui élèverait l'activité antimicrobienne.

L'estimation de la CMI et CMB/CMF a démontré que l'HE d'origan testée a un pouvoir bactéricide sur 06 bactéries parmi les 09 testées et un pouvoir fongicide parmi les deux levures testées. Par contre l'HE du thym a un pouvoir bactéricide sur toutes les bactéries et fongicide sur les deux levures. Nous pouvons dire que l'HE du *Thymus guyonii* a révélé, à la fois une bonne activité bactéricide et fongicide meilleure que l'HE d'*Origanum floribundum*. Ces activités encouragent l'application des HE testées aux produits pharmaceutiques.

L'importante action antimicrobienne est due à l'HE de *Thymus guyonii* et *Origanum floribundum* sont en relation avec leur forte teneur en thymol et carvacrol. Ces composés phénoliques sont responsables d'une action bactéricide rapide traversant la paroi bactérienne en dénaturant les protéines. Le thymol et le carvacrol à doses minimales sont considérés comme bactériostatiques.

Des pommades à usage topique ont été préparées en respectant les règles BPF. Les propriétés organoleptiques montrent qu'elles sont de couleur jaune, rigide, lisse, d'aspect brillant, ayant une odeur très agréable. Elles sont douces à l'application, exactement homogènes, stables et possédant un pH de 6-6,5.

Le contrôle de la qualité microbienne des pommades dermiques nous a permis de déduire que les lots de pommades testés sont exempts de toutes contaminations microbiennes et affirmés conformes et purs à la consommation. L'emploi des HE comme conservateurs et aromatiques sont ajustées à la formulation.

Les pommades des HE de *Thymus guyonii* et d'*Origanum floribundum* préparées sont non irritantes pour la peau. Elles montrent des IP de ($0,21 < 0,5$ pour le thym) et ($0,25 < 0,5$ pour l'origan). Ces dernières peuvent être utilisées pour des traitements topiques. Elles possèdent aussi un bon pouvoir cicatrisant à

partir de 0,5% d'HE puis 1% incorporées à la formulation de la pommade dermique. A la concentration de 0,5% la pommade du thym a un pouvoir cicatrisant supérieur à la pommade de référence représenté par le Madécasol®.

Nous avons remarqué que l'inflammation disparaît assez vite avec la pommade de référence et celles des pommades à base des HE de thym et d'origan. Il est recommandé de tester leur activité anti-inflammatoire de façon approfondie.

Perspectives :

Cette étude a permis de valoriser ces plantes à parfum et de trouver de nouvelles applications dans plusieurs domaines de pointe économiques comme la dermatopharmacie. Elle permet d'orienter nos expérimentations vers d'autres vertus thérapeutiques des HE de thym et d'origan comme :

- Préparation de médicaments à utilisation interne après de recherches approfondies sur la toxicité aiguë des HE de *Thymus guyonii* et *Origanum floribundum* en étudiant la dose adéquate.
- Activité anti-inflammatoire
- Activité sédatif
- Activité antalgique
- Activité diurétique

Il serait important d'étudier les extraits de la plante ainsi que l'hydrolat repris lors de l'hydrodistillation de la plante et d'analyser leurs capacités pharmacologiques.

En effet, l'eau florale ou l'hydrolat des 2 espèces testées n'a fait l'objet d'aucune étude scientifique approfondie et forme donc un créneau de recherche intéressant que nous entamerons dans des études de recherche futures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Beloued, A., «Plantes médicinales d'Algérie», Office des publications universitaires, Alger, (2012), 284p.
2. Buronzo A.M., «Grand guide des huiles essentielles», édition Hachette pratique, France, (2008) ,254P.
3. Kaloustian, J. et Hadji-Minaglou, F., «La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie », édition Springer, France, (2012) ,219P.
4. Zhiri, A et Baudoux, D., «Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies », édition Inspir Development, Luxembourg, (2005), 80P.
5. Bremness, L., «Plantes aromatiques et médicinales », édition Larousse, Paris, (2005), 304P.
6. Leger, C., «Vitamine E tocophérol et composés apparentés », édition Poly technica Paris, (1992) ,157P.
7. Atmani, D. et *al.*, «Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants », Food chemistry, 112, (2009), 303-309.
8. Adam, G., Wittner, L. et Mandigon, C., «Les épices de la santé », édition Ambre, Dijon-Quetigny, (Août 2003), 318P.
9. Speck, B., Fotsch, U.C. et Wacker, S., «Connaissance des herbes : Origan », EGK, Caisse de Santé, Newsletter Lausanne (Aout 2008), 4P.
10. Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Skali, N.S. et Abrini, J., «Thymus essential oil: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities », Congrès international de Biochimie Agadir, Maroc, 09-12 Mai 2006.
11. Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R., «Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Limiaceae species grown in Turkey», J. Agric. Food Chemi, 2004, 52, 762-770.
12. Simpson, M.G., «Plant systematic», 2nd Edition Elsevier academic press, California, (2010), 752P.
13. Goetz, P. et Ghedira, K., «Phytothérapie anti-infectieuse», Edition Springer-Verlag, France, (2012), 382P.

14. Dobignard, A. et Chatelain, C., « Index synonymique flore d'Afrique du nord », volume 4, édition des conservatoire et jardin botaniques, Genève, (2012), 431P.
15. Anonyme, 2013., Tela Botanica, <https://www.tela-botanica.org/isfan-nn-144379-ecologie>.
16. Seidemann, J., « World Spice Plants », Edition Springer-Verlag, Berlin, (2005), 591P.
17. Baba Aissa, F., « Encyclopédie des plantes utiles », éditions el Maarifa, Alger, (2011), 471P.
18. Ietswaart, J. H., « A taxonomic revision of the genus Origanum(Labiatae) », editor Leiden botanical series, V 4, Boston(1980), 153P.
19. Quezel P. et Santa, S., « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques », Tome II, édition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, (1963), 600P.
20. Rodet, H.J.A., « Botanique agricole et médicale ou étude des plantes », éditeur C, Baillet, Paris, (1872), 1078P.
21. Wolfgang, H., « 350 plantes médicinales », éditeur Delachaux et Niestlé, Paris, (2008), 131P.
22. Kokkini, S., « Proceedings of the IPIGRI international workshop of Oregano », editor S.Padulosi, Rome, (1997), 182P.
23. Daoudi-Merbah, F. et Dahmani-Megrerouche, M., « Contribution à la caractérisation de la niche écologique d'espèce menacée: Elément pour sa conservation et sa valorisation », USTHB-FBS- 4th International Congress of the Populations & Animal Communities « Dynamics & Biodiversity of the terrestrial & aquatic Ecosystems », CIPCA4 Taghit (Bechar)-Algeria, 19-21 November, 2013.
24. Machu, A., « Origanum vulgare », Faculté Libre des Sciences et Technologies, Lille (France), 2008, 6p.
25. Anton, R. et Strasbourg, A.L., « Plantes aromatiques : épices aromates, condiments et huiles essentielles », édition Tec & Doc, Paris (2004), 522P .
26. Peter, K.V., « Handbook of herbs and spices », Volume 2 édition CRC Press, Cambridge, (2004), 365P.

27. Chiej, R., « Les plantes médicinales », édition Solar, Guide vert, Paris,(1982), 445P.
28. Goetz, P, Paris, M. et *al.*, « Phytothérapie la santé par les plantes», édition Vidal, Bobigny, (2007), 447P.
29. Ochoa, L.R.H., « Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné solvant /actif d'origine végétale », thèse de Doctorat en sciences des procédés, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, (2005), 225.
30. Le Page, R. et Meudec, G., « L'abc du potager geste par geste», édition Rustica, Paris (février 2002), 240P.
31. Figueredo, G., « Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne », thèse de Doctorat en chimie organique, Ecole doctorale des sciences fondamentales, Université Blaise Pascal, France, (2007), 194P.
32. Caillaud, M.A., « Etude de l'espèce *Origanum vulgare* L », thèse de Doctorat en pharmacie, UFR Sciences pharmaceutiques et biologiques, Université de Nantes, France, (2013), 126P.
33. Hazzit, M., « Etude de la composition chimiques des huiles essentielles de différentes espèces de Thym et d'Origan poussant en Algérie », thèse de Doctorat en Chimie, Université des sciences et de la technologie Houari Boumedienne, Alger, (2008) ,204P.
34. Kintzios, S.E., « Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia* (Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles)», Taylor & Francis, New York, (2002), 267P.
35. Ali-Delille, L., « Les plantes médicinales d'Algérie », troisième édition, édition Berti, Alger, (2013), 239P.
36. Leung, A and Foster, S.,« Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics», second edition, editor John, Willey & sons, USA, (1995), 688P.
37. Hazzit, M., Baaliouamer, A., Faleiro, M.L. et Miguel, M.G., « Composition of essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algéria and their antioxidant and antimicrobial activities», Journal of Agricultural and Food Chemistry, (2006), 54 (17), 6314-6321.

38. Veres, K., Varga, E. et al., « Investigation of the composition and stability of the essential oils of *Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*(link) Eetswaart », *Chromatographia*, (2003), 57, pp 95-98.
39. D'Antuono, L.F., Galletti, G.C. and Bocchinis, P., « Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L, populations from north Mediterranean area(Liguria region, northern Italy)», *Annals of Botany*, (2000), 86, 471-478.
40. Radusiene, J., Ivanauskas, L., Janulis, V. and Jakstas, V., « Composition and variability of phenolic compounds in *Origanum vulgare* from Lithuania», *Biologija*, (2008), Vol 54, Nr1, pp 45-49.
41. Mockutė, D., Judpientienė, A. and Bernotienė, G., « Volatile constituents of cultivated *Origanum vulgare* L. inflorescences and leaves», *Chemija*, (2004), T 15, Nr 1, pp 33-37.
42. Ursula, B.S., Fotsch, C. et Wacker, S., « Connaissance des herbes : Thym », EGK, Caisse de Santé, Newsletter Lausanne (Aout 2008), 4P.
43. E Stahl-Biskup and F Sàez., « Thyme. The genus *Thymus*», Taylor & Francis, (2002), 330P.
44. Anonyme 2013., Tela Botanica, <https://www.tela-botanica.org/isfan-nn-145345-synthese>.
45. Miara, M.D., « Etat des connaissances et mesures de conservation de la flore endémique dans l'Atlas tellien occidental d'Algérie », 1st Mediterranean Plant Conservation Week, (24-29 October 2016), Ulcinj, Montenegro, 20P.
46. Huete, A., « Huiles essentielles pour tous les jours », éditions Artémis, France, (2012), 224P.
47. Battandier, JA., & Trabut LC., « Flore de l'Algérie Dicot ». France. (1890).1(4). P 671.
48. Morales, R., « The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In Thyme: the genus *Thymus*. Medicinal and aromatic plants - Industrial profiles ». Stahl - Biskup, E; Saez, F., Eds Taylor & Francis (vol.17). London, 2002.
49. Jalas J., « Note of *Thymus* L. (Labiatae) in Europe 1. Supraspecific classification and nomenclature», *Bot, J, Linn. Soc.*, (1971), vol. 64, pp: 199-215.
50. Chopra IC., Abrol BK., Handa KL., Paris R. et Dillemann G., « Les plantes

- médicinales des régions arides». UNESCO, Paris,(1960), 99P.
51. Callery, E., « Le grand livre des herbes». Editions Konemann, France, (1998), 128P.
 52. Cornillot, P., « Guide pratique des remèdes naturels». éditions Sélection du Reader's Digest, Paris (1995), 332P.
 53. Rodzko, V., « Abécédaire de phytothérapie». France, (1999-2000), 125P.
 54. Barnes, J., Anderson, L.A. and Phillipson, J.D., « Herbal Medicines». Pharmaceutical Press, third edition, USA, (2007), 710P.
 55. Denys J.C., « Antioxidant properties of spices, herbs and other sources». Edition Springer, New York, (2013), 610P.
 56. Grosjean, N., «L'aromathérapie tout simplement», édition Eyrolles, Paris(2007) ,361P.
 57. Lucchesi, M.E., « Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles », thèse de doctorat en sciences, Université de la Reunion Faculté des Sciences et Technologies,(2005),143P.
 58. Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J.M., Bernardini, J.F. & Costa, J., « Antimicrobial activity and chemical composition of *origanum glandulosum* Desf . Essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation», Food chemistry, (2007), 106, pp 132-139.
 59. Paris, R.R. et Moyse, H., « Précis de matière médicale », Tome I, édition Masson et Cie, Paris, (1965),416P.
 60. Lardy J.M. et Haberkorn V., « Les huiles essentielles: principes d'utilisation», Kinésithérapie, la Revue, (Janvier 2007), V 7, Issu 61 pp 18-23.
 61. Bachelot, C., Blaise, A., Corbel, T. et Le Guernic, A., « Les huiles essentielles », Licence 2 Biologie, France, (2006), Université Catholique de l'Ouest Bretagne Nord, 26P.
 62. Bruneton, J., « Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales », édition Tec & Doc, Paris, (1999) ,585P .
 63. AFNOR (Association Française de Normalisation)., « Huiles essentielles, Tome 2 .Monographies relatives aux huiles essentielles », Paris, (2000) ,323P .

64. Lahlou, M., « Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils », *Phytotherapy Research*,(2004), 18,pp 435-448.
65. Skoog, D.A., Holler, F.J. et Nieman, T.A., « Principes d'analyse instrumentale», Edition De Boeck University, Paris, (2003) ,945P.
66. Tranchant, J., Arpinaud, P., Prevote, A., Serpinet, J., Vergnol, A. et Witier P., « Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse », édition Masson, Paris,(1995), 700P.
67. Richard, H. et Multon, J.L., « Les arômes alimentaires »,édition Tec & Doc Lavoisier, Paris,(1992),439P.
68. Cavalli J. F., 2002. , « Caractérisation par C.P.G/IK, C.P.G/SM et R.M.N.du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar », thèse de doctorat, Université de Corse, France, (2002), 261P.
69. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M.,« Antioxidant in food: practical applications», ed Woodhead, (2000), 388P.
70. Braga, P.C., Dal Sasso M., Culici, M.,Gasastri , L ., Marceca ,M.X et Guffanti, F.F., « Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems», *Pharmacology*, (2006), Vol, 76, pp 61-68.
71. Pauli, A., « Antimicrobial properties of essential oil constituents», *international journal Aromatherapy*, (2001), 11, 126-133.
72. Fabian, D., Sabol, M., Domaracké, K., Bujnéková, D., « Essential oil- their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability», *Toxicology in vitro*, (2006), 20, 1435-1445.
73. Kalemba, D., Kunicka, A., « Antibacterial and antifungal properties of essential oils », *Current Medicinal Chemistry*, (2003), 10, pp: 813-829.
74. Martini, M. C., « Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie», édition Tec & Doc, (2^{ème} édition), Paris,(2006), 411P.
75. Padrini, F et M.T, Lucheroni De Vecchi., « Le grand livre des huiles essentielles », édition De Vecchi, Paris, (2003), 206P.
76. Goetz, P., « La phytocosmétologie thérapeutique », édition Springer-Verlag, Paris, (2007), 257P.
77. Svoboda, K.P. and Svoboda, T.G.,« Secretory structures of aromatic and medicinal plants», Polly M Syred, UK (2000), 60P.

78. Köppen, W.P., « Classification des climats fondés sur les précipitation et les températures ». Allemagne, (1900).
79. Hamimeche M., « Relation végétation- avifaune dans le secteur Est (Hammam Melouane) du Parc National de Chréa (Wilaya de Blida) », thèse de magister en sciences agronomiques option biodiversité et biotechnologies végétales, Institut National Agronomiques, El Harrach-Alger, Juillet 2007, 196P.
80. Aissaoui, A., « Hydrologie et hydrogéologie du bassin versant de l'oued M'ZI (Laghouat, Algérie) », thèse de magister en Sciences de la terre option hydrogéologie, Faculté des sciences de la terre et de l'univers, université d'Oran2, (2016), 160P.
81. Attalah, C., « Cartographie et protection qualitative des eaux souterraines en zone aride, cas de Milok- Metlili, Atlas saharien central (Laghouat - Algérie) » thèse de magister en science de la terre option hydrogéologie, Faculté des sciences de la terre, de la terre, de géographie et d'aménagement du territoire, université d'Oran, (2013), 196P.
82. Prat, R., « Expérimentation en biologie et physiologie végétales : trois cents manipulations », édition Quæ, Hermann editeurs, Paris(2007), 296P.
83. GABE, M., « Techniques histologiques », édition Masson et Cie, 1968, 1113P.
84. Anonyme., « Pharmacopée Européenne », 6eme édition, (2008).
85. Itoua-Apoyolo, C.M., Abderamane, M., Ouamba, J.M., Matokot, L. et Mvila, CA., « Caractérisation chimique des huiles essentielles extraites de *Chenopodium Ambrosioides L.*, de *Eucalyptus Citriodora Hook* et effets biologiques sur *Caryedon Serratus OL. (Coleoptera-Bruchidae)* », Annales université Marien Ngouabi, Congo, (2003), 4(1), 12P.
86. Menaceur, F., « Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles et extraits du romarin (*Rosmarinus eriocalyx*) et de la lavande (*Lavandula stoechas*) », mémoire de magister en sciences agronomiques option sciences alimentaires. Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA ex: INA Alger), 2011, 187P.
87. Outaleb,T., « Huiles essentielles et extraits de romarin: composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne », mémoire de magister en sciences agronomiques option sciences alimentaires. Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), 2010, 161P.

88. Cuendet, M., Hostettmann, K. et Potterat, O., « Iridoid glycosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei* », Helvetica chimica acta, (1997), Vol 80 (4), pp 1144-1152.
89. Burits, M. et Bucar, F., « Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil », Phytotherapy research, (2001), 14, pp 323-328.
90. Oyaizu, M., « Studies of product of browning reaction prepared from glucose amine», Japan Journal of Nutrition, (1986), 44, 307-315.
91. Zaika, L.L., « Spices and herbs-Their Antimicrobial Activity and its Determination », Journal of Food Safety, (1988),9(2), pp: 97-118.
92. Haddouchi, F., Lazouni, H A., Meziane, A. et Benmansour, A., « Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanessi* Bois & Reut », Afrique Science, (2009),05(2), pp 246-259.
93. Chikhoun, A., « Huiles essentielles de Thym et d'Origan », thèse de magistère en Agronomie option sciences alimentaires, Institut National Agronomique El Harrach, Alger, (2007), 178P.
94. Anonyme., « AFNOR, antiseptiques et désinfectants », 2ème édition, (1989), recueil des normes françaises (version, anglaise et française).
95. Courvalin, P., Leclercq, R. et Bongen, E., « Antibiogramme », édition ESKA , 3^{ème} édition, Paris, (2012), 800P.
96. Mutai, C., Bii, C., Vagias, C., Abatis, D. et Roussis, V., « Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes ». Journal of Ethnopharmacology, (2009),123: 143-148.
97. Mohammedi, Z., « Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen », thèse de magistère en biologie option produits naturels, activités biologiques et synthèse, Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen, (2006), 155P.
98. Mebarki, N., « Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanessi* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne », thèse de magistère en génie des procédés chimiques et pharmaceutiques option industrie pharmaceutique, Université M'hamed Bougara, faculté des hydrocarbures et de la chimie, Boumerdes, 2010, 185P.
99. Le HIR, A.,« Pharmacie galénique : bonnes pratiques de fabrication des médicaments», édition Masson, Paris, (2001), 402P.

100. Catier, O. et Roux, D., « Botanique Pharmacognosie phytothérapie », édition Wolters Kluwer, France, (2007) ,141P.
101. Fonteneau, J.M. et Klusiewicz, P., « Travaux pratiques de préparation et de conditionnement des médicaments », édition Porphyre, Wolters Kluwer, France, 2008, 281P.
102. Rowe, C.R., Sheskey, P.J. and Quinn, M.E., « Handbook of pharmaceutical excipients », Phamaceutical Press and American Pharmacists Association, Washington, 2009, 888P.
103. Mautrait, C. et Raoult, R., « La préparation : mode d'emploi officine, sous-traitance et BP », édition Porphyre, Wolters Kluwer, France, 2009, 468P.
104. Le Hir, A., Chaumeil, J.C. et Brossard,., « Pharmacie galénique : bonnes pratiques de fabrication des médicaments », édition Masson, Paris, (2009), 382P.
105. Boukhatem, M.N., « Extraction, caractérisation des huiles essentielles du *Geranium Rosat* et formulation d'une pommade à effet cicatrisant », thèse de magister en Biotechnologies végétales, Université Saad Dahleb, faculté des sciences agro-vétérinaire et biologique, Blida, 2010, 106P.
106. Anonyme., « Pharmacopée européenne », 4^{ème} édition, strasbourg, 2002.
107. Cohen, Y. et Pradeau, D., « Analyse pratique du médicament », édition Cachan médicales internationales, 1992, 1067P.
108. Pourrat, A., Arvouet-Grand, A., Lejeune, B., Bastide, P., Privat, A.M. et Legret, P., « Extrait de propolis : II Etude de la cicatrisation de plaies chez le lapin », Journal de Pharmacie de Belgique, (1993), 48, 3, pp 171-178.
109. Werker, E., Putievsky, E. and Ravid, U., « The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgare* L », Annals of Botany, (1985), volume 55, issue 6, pp 793-801.
110. Bosabalidis, A., Gabrieli, C. and Niopast, L., « Flavone aglycones in glandular hairs of *Origanum x intercedens* », Phytochemistry, (1998), vol 49, N° 6, pp 1549-1553.
111. Baser, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Houmani, Z. and Abed, L.,« Composition of the essential oil of *origanum floribundum* Munby from Algeria », Journal Of Essential Oil Research,(2000),12, pp 753-756.
112. Brada, M., Saadi, A., Wathlet, J.P. et al., «The essential oils of *Origanum*

- floribundum* Munby in Algeria ». *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, (2012), 15(3): 497-02.
113. Zeghib, A., Kabouche, A., Laggoune, S., Calliste, C.A., Simon, A., Bressolier, P., Aouni, M., Duroux, J.L. and Kabouche, Z., « Antibacterial, Antiviral, Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Thymus guyonii* Essential Oil ». *Natural Product Communications*, (2017), Vol. 12, (10), 1651 - 1654.
114. Ghorab, H., Kabouche, A. and Kabouche, Z., « Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa ». *J. Mater. Environ. Sci*, (2014), 5, (1), 298-303.
115. Hamrouni Sellami, I., Maamouri, E., Chahed, T., Aidi Wannes, W., Kchouk, M. E. et Marzouk, B., « Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) », *Industrial Crop and Products*, (2009), 30, pp 395-402.
116. Boulaghmen, F., « Extraction des huiles essentielles de l'origan ». Thèse de Magistère en Biotechnologie végétales option Biologie, Université Saad Dahlab de Blida, Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques, (2012), Blida, 143p.
117. El Ouali. Lalami, A., El-Akhal, F., Ouedhiri, W., Ouazzani. Chahdi, F., Guemmouh, R. et Greche, H., « Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain: *Thymus vulgaris* et *Thymus satureioidis* ». *Les Technologies De Laboratoire*, (2013), Vol. 8, N°31.
118. Aberchane, M., Fechtal, M., Chaouch, A. et Bouayoune, T., « Influence de la durée et de la technique d'extraction sur le rendement et la qualité des huiles essentielles du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica manetti*) ». *Annales de la recherche forestière au Maroc*, (2001), ISSN 0483-8009 CODEN AFRMA, 34, 110-118.
119. Bourkhiss, M., Hnach, M., Bourkhiss, B., Ouhssine, M., Chaouch, A. et Satrani, B., « Effet du séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) ». *Masters Agrosolution*, (2009), 20 (1), 44-48.
120. Boulaghmen, F., Chaouia, C., Hazzit, M., Nouas, M. et Saidi, F., «

- Composition chimique et activité antimicrobienne d'huile essentielle extraite de *Thymus guyonii* de Noé d'Aflou- Algérie ». *Agrobiologia* (2018), 8(1): pp 853-862.
121. Bousbia, N., « Extraction et identification de quelques huiles essentielles (Nigelle, Coriandre, Origan, Thym et Romarin). Etude de leurs activités antimicrobiennes », thèse de magister en Sciences agronomiques option Sciences alimentaires, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie-El Harrach, Alger, (2004), 182P.
 122. Bruneton, J., « Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales », 4ème édition Tec & Doc, Paris, (2009) ,1292P .
 123. Kpoviessi, D.S.S., Accrombessi, G.C., Kossouh, C., Soumanou, M.M. et Moudachirou, M., « Propriétés physico-chimiques et composition de l'huile non conventionnelle de poughère (*Jatropha curcas*) de différentes régions du Bénin », *Comptes Rendus Chimie*, (2004), 7, pp 1007-1012.
 124. Noudogbessi, J.P., Kossou, D. et Sohounhloué, D.C.K., « Composition chimique et propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Pimenta racemosa* (Miller) et de *Chromolaena odorata* (L. Robinson) Acclimatées au Bénin », *J. Soc. Ouest-Afr. Chim*, (2008), 026, pp 11-19.
 125. Kango, C., Sawalihou, B.E.H., Kone, S., Koukoua, G. et N'Guessan, Y.T., « Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* », *Comptes Rendus Chimie*, (2004), 7, pp1039-1042.
 126. Boukhatem, M., Hamaidi, M., Saidi, F. et Hakim, Y., « Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie) », *Nature & Technologie*, (2010), n°3, pp 37-45.
 127. Fellah, S., Romdhane, M. et Abderraba., « Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie », *J. Soc. Alger. Chim*, (2006), 16 (2), pp 193-202.
 128. Kabouche, A., Kabouche, Z. and Bruneau, C., « Analysis of the essential oil of *thymus numidicus* (Poiret) from Algeria », *Flavour and Fragrance Journal*, (2005), 20, pp 235-236.
 129. Salgueiro, L. R. et al., « Antifungal activity of the essential oil of *thymus*

- capitellatus against *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte strains », *Flavour and Fragrance Journal*, (2006), 21, pp 749-753.
130. Babushok, V.I., Linstrom, P.J. and Zenkevich, I.G., « Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils ». *J. Phys. Chem.* (2011) Ref. Data, Vol. 40, No. 4.
131. Houmani, Z., Azzoudj, S., Naxakis, G. and Melpomeni, S., « The essential oil composition of Algerian Zaâtar: *Origanum spp* and *Thymus spp* », *Journal Of Herbs, Spices & Medicinal Plants*,(2002), volume 9, issue 4, pp 275-280.
132. Aggoune, K. et Harfi, B., « Huiles essentielles de Thym et d'Origan : composition chimique et activité antimicrobienne», thèse d'ingénieur en sciences agronomique, Institut National Agronomique, El Harrach Alger, 2006,98P.
133. Daoudi-Merbah, F., Hazzit, M. et Dahmani-Megrerouche, M., « Influence of morphological variability and habitat on the chemical composition of essential oil of an Algerian endemic *Origanum* species (*Origanum floribundum* Munby) ». *Chemistry and Biodiversity*, (2016), 13: 1088-94.
134. Ksouri, S., Djebir, S., Bentorki, A. et al., « Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L and *Thymus ciliatus* Desf against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis ». *Journal de mycologie médicale*, (2017), 27(2): 245-49
135. Kerbouche, L., Hazzit, M., Ferhat, M.A. et al., « Biological activities of essential oils and ethanol extracts of *Teucrium polium* subsp. capitatum (L.) Briq.and *Origanum floribundum* Munby». *Journal of essential oil-bearing plants*, (2015),18(5): 1197-08
136. Mechergui, K. et al., « Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *Glandulosum* (Def) letswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity », *Journal Science Food Agriculture*, (2010), 90, pp 1745-1749.
137. Mechergui, K., Jaouadi, W., Coelho, J.A., Serra, M.C. et Khouja, M.L., « Les activités biologiques et les propriétés de l'huile de l'*Origanum glandulosum* Def ». *Phytothérapie*, (2016), 14, pp: 102-108.
138. Belkamel, A., Bammi, J., Belkamel, A. et Douira, A., « Etude de la composition de l'huile essentielle d'une endémique Ibéro-marocaine: *Origanum*

- compactum* (Benth.) », Journal of Animal & Plant Sciences, (2013), vol.19 issue 1, pp 2880-2887.
139. Baser, K.H.C. and Buchbauer, G., «Handbook of essential oils : Science, Technology and Applications», editors Taylor & Francis, USA (2010), 975P.
140. Zeghib, A., Kabouche, A., Laggoune, S., Calliste, C.A., Simon, A., Bressolier, P., Aouni, M., Duroux, J.L. and Kabouche, Z., « Antibacterial, Antiviral, Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Thymus guyonii* ». *Essential Oil. Natural Product Communications*, (2017), Vol. 12, (10), 1651 - 1654.
141. Lehbili, M., Chibani, S., Kabouche, A., Semra, Z., Smati, F., Abuhamdah, S., Touzani, R. et Kabouche, Z., « Composition, antibacterial and antioxidant activity of essential oil of *Thymus guyonii* de Noé from Algeria ». *Der Pharmacia Lettre*, (2013), 5 (2): 306-310.
142. Ghorab, H., Kabouche, A. and Kabouche, Z., « Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa ». *J. Mater. Environ. Sci.* 5, (2014), (1), 298-303.
143. Senatore, F., « Influence of harvesting time on yield and composition of essential oil of a thyme(*Thymus pulegioides* L.)growing wild in Campania (Southern Italy) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1996), 44 (5), 1327-1332.
144. Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N. & Lanaras, T., « Autumn essential oils of Greek oregano », *Phytochemistry*, (1997), 44 (5), 883-886.
145. Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P.& Carnacini, A., «Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letsvaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inluorescences ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1998), 46 (9), 3741-3746.
146. Karousou, R., Karousou, R., Koureas, D.N. & Kokkini, S., « Essential oil composition is related to the natural habitats : *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete », *Photochemistry*, (2005), 66 (22), 2668-2673.
147. Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B. and Ehlers, B., « Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and

- composition in essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes », J chem. Ecol. 29, (2003) 859-880.
148. Vazirian, M., Mohammadi, M., Farzei, MH., Amin, G. and Amanzadeh, Y., « Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* essential oil from Iran », Research Journal of Pharmacognosy, (2015), 2(1), pp 41-46.
149. Bouhdid, S., Skali, S.N., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Amensour, M. et Abrini, J., « Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil », African Journal of Biotechnology, (2008), vol.7 (10), pp 1563-1570.
150. Bektas, E., Daferera, D., Sokmen, M. and *al.*, « In vitro antimicrobial, antioxidant and antiviral activities of the essential oil and various extracts from *Thymus nummularis* M. Bieb », Indian Journal of Traditional Knowledge, (2016), vol.15 (3), pp 403-410.
151. Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. and Khosnoodi, M., « In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss », Food control, (2007),18,pp 800-805.
152. Loizzo, M.R. et *al.*, « Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils », Food Chemistry, (2009), 117, pp 174-180.
153. Tamert, A. et Latreche, A., « Activité antioxydante des extraits de six Lamiaceae aromatiques de l'Algérie occidentale ». , Phytothérapie, (2015), pp 1-8.
154. Newman. et Keuls., « Test statistique. Analyse de comparaison des moyennes (1952)», cahiers d'exercices 17ème édition (2000), 30P.
155. Menaceur, F., « Contribution à l'étude phytochimique et biologique de l'érigeron, du fenouil commun, de la lavande et du genévrier », thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA ex: INA Alger), 2015, 221P.
156. Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. and Tikkanen, M.J., « Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs », Food Chemistry, Vol. 83, pp 255-262.

157. Benchabane, O., Hazzit, M., Mouhouche, F. and Baaliouamer, A., « Influence of extraction duration on the chemical composition and biological activities of essential oil of *Thymus pallescens* de Noé », Arab J Sci Eng, (2015), 40: 1855-1865.
158. Touaibia, M. et Chaouch, F.Z., « Propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de *Myrtus nivellei* Batt et Trab. obtenus in situ et in vitro », Phytothérapie, (2017), 15 : 16-22.
159. Cook, NC. and Samman, S., « Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotectives effects and dietary sources », J Nutr, Biochem, (1996),7: 66-76.
160. Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L., « Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure - activity relationships », Free Radic Biol Med, (1997), 22: 749-60.
161. Di Carlo, G., Mascojo, N., Izzo, A. A. *et al.*, « Flavonoids: new aspects of a class of natural therapeutic drugs, Life Sci (1999), 65: 337-53.
162. Hassane, S.O.S., Ghanmi, M., Satrani, B. *et al.*, « Composition chimique et bioactivité des huiles essentielles de deux provenances d'*Ocimum canum* S. de l'île de la grande Comore », Phytothérapie, (2011), 9, pp 18-24.
163. Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L. et Vergnes, M.F., « Etude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne », Phytothérapie, 6: 160-164.
164. Mind, B.J. and OH, J.H., « Containing *Origanum (Thymus capitatus)* oil against Gram-negative pathogenic bacteria », Journal Food Science, (2009),vol. 74, Nr 4.
165. Hazzit, M., Baaliouamer, A., Verissimo, A.R., Faleiro, M.L. and Miguel, M.G., « Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils », Food Chemistry, 116, (2009), 714-721.
166. Chishti, S., Kaloo, Z.A. and Sultane, P., « Medicinal importance of genus *Origanum* - A review », International Journal of Advanced Research (2013), Volume 1, issue 8, pp 75-84.
167. Chevallier, A., « Herbal remedies », First American Edition, USA, (2007), 292P.
168. Coccimiglio, J., Alipour, M., Jiang, Z.H. *et al.*, « Antioxidant, antibacterial

- and cytotoxic activities of the ethanolic *Origanum vulgare* extract and its major constituents », *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume (2016), Article ID 1404505, 8 pages.
169. Shapiro, S., Meier, A. and Guggenheim, B., « The antimicrobial activity of essential oils and essential oils components toward oral bacteria », *Oral Microbiol Immunol*, (1994), 9: 202-8.
170. Fertout-Mouri, N., Latrèche, A., Mehdadi, Z., Toumi-Bénali, F. et Khaled, M.B., « Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale) », *Phytothérapie*, (2017), 15: 346-353.
171. Ghannadi, A., Sajjadi, S.E., Kabouche, A. and Kabouche, Z., « *Thymus fontanessi* Boiss. & Reut - A potential source of thymol-rich essential oil in north Africa », *Z Naturforsch C*, (2004), 59 (3-4): 187-9.
172. Belkamel, A., Bammi, J., Belkamel, A. et Douira, A., « Etude de la composition d'une endémique Ibéro-Marocaine: *Origanum compactum* (Benth.) », *Journal of Animal & Plant Sciences*, 2013, vol, 19, Issue 1: 2880-2887.
173. Fadli, S. et Kessi, A., « Composition et activité des huiles essentielles du thym et de l'origan: *Thymus mumidicus poiret* et *Origanum floribundum Munby* », thèse d'ingénieur en sciences agronomique, Institut National Agronomique, El Harrach Alger, (2005), 92P.
174. Kaci, M. et Alloun K., « Huiles essentielles et extraits d'*Origanum floribundum* et de *Ruta montana*: composition chimique, activité antioxydante et antimicrobienne », thèse d'ingénieur en sciences agronomique, Institut National Agronomique, El Harrach Alger, (2010), 143P.
175. Challal, R., « Etude comparative entre deux méthodes d'extraction (l'hydrodistillation et l'hydrodiffusion assistée par micro-onde et gravité) et caractérisation de l'huile essentielle d'origan (*Origanum vulgare subsp Glandulosum*) », thèse d'ingénieur en sciences agronomique, option sciences alimentaires, université Saad Dahlab de Blida, (2009), 95P.
176. Guignard, J.L., « Biochimie végétale », édition Masson, Paris (2000), 254P.
177. Billerbeck, V.G., Roques, C., Vanière, P. et Marquier, P., « Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles », *Revue Hygiènes*, (2002), volume X, n°3, pp 248-251.

178. Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T. et al., « Antimicrobial activity of mint essential oils », Journal of Agricultural and Food Chemistry, (1995), 43, pp 2384-2388.
179. Haddouchi, F. et Benmansour, A., « Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques », Les Technologies de Laboratoire, Janvier-Février 2008, N°8, pp 20-27.
180. Prescott, L M., Harley, J P. et Klein, D A., « Microbiologie », édition de Boeck & Larcier, s.a, (2003), Bruxelles, 1137P.
181. Amara, N. et Bougherara, Y., « Activité antimicrobienne de l'huile essentielle du cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.) », Algerian Journal of Natural Product, (2017), 5: 2, pp 455-462.
182. Chao, S.C., Young, D.G. and Oberg, C.J., « Screening for inhibitory activity of essential oil on selected bacteria, fungi and viruses », J Essential Oil Res, (2000), 12: 639-49.
183. Kalemba, D. and Kunicka, A., « Antibacterial and antifungal properties of essential oils », Curr Med Chem, (2003),10: 813-29.
184. Smith-Pamer, A., Stewart, J. and Fyfe, L., « Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens », Lett Appl Microbiol, (1998), 26: 118-22.
185. Firas, A., Al Bayati., « Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oil and methanol extracts », Journal of Ethnopharmacology, 116, (2008), 403-406.
186. Deans, S.G. et Ritchie, G., « Antibacterial properties of plant essential oils », Journal of Food Microbiology, (1987), 5, pp 162-180.
187. Belgin, C., Arzu, T., Arif, I., Bilal, G. and Neset, A., « Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Letswaart, an endemic species to Turkey », Molecules, (2009), 14, pp 1702-1712.
188. Sari, M., Biondi, D.M. et al., « Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf », Flavour and Fragrance Journal, (2006), 21, pp 890-898.
189. Pibiri, M.C., « Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de

- ventilation au moyen d'huiles essentielles », thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse, (2006), 177P.
190. Mann, C., Cox, S. and Markham, J., « The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) », Lett Appl Microbiol, (2000), 30: 294-7.
191. Longbottom, C.J., Carson, C.F., Hammer, K.A. et al., « Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes », J Antimicrob Chemother, (2004), 54: 386-92.
192. Ultee, A. et al., « The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus* », Applied and Environmental Microbiology, (2002), 68, pp 1561-1568.
193. Nostro, A., Marino, A., Blanco, A.R. et al., « In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact », Journal of Medical Microbiology, (2009), 58, 791-797.
194. Boskovic, M., Zdravkovic, N. et al., « Antimicrobial activity of thyme (*Thymus vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms », Procedia Food Science, 5, (2015), 18-21.
195. Dorman, H.J.D. and Deans, S.G., « Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils », Journal of Applied Microbiology, (2000), 88 (2), pp: 308-316.
196. Al-Shuneigat, J., Al-Sarayreh, S. et al., « Effects of wild *Thymus vulgaris* essential oil on clinical isolates biofilm-forming bacteria », Journal of Dental and Medical Sciences, vol 13, issue 9, (2014), pp 62-66.
197. Cacciatore, I., Di Giulio, M., Fornasari, E. et al., « Carvacrol codrugs: a new approach in the antimicrobial plan », Plos one, 10(4), (2015).
198. Walsh, S.E. et al., « Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram positive and Gram negative bacteria », Journal of Applied Microbiology, (2003), 94, pp 240-247.
199. Trombetta, D., Castelli, F., Grazia, S.M. et al., « Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes », Antimicrob Agents Chemother », (2005), 49(6): pp 2474-8.

200. Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B. *et al.*, « Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc », *phytothérapie*, (2011), 9: 149-157.
201. Jnaïd, Y., Yacoub, R. and Al-Biski, F., « Antioxidant and antimicrobial activities of *Origanum vulgare* essential oil », *International Food Research Journal*, (2016), 23(4): 1706-1710.
202. Mohammedi, Z., Bachik, S. et Belkaroube, N., « Potentiel antifongique et antiaflatoxinogène des huiles essentielles d'une plante endémique *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. », *Les Technologies de Laboratoire*, (2010), Vol 5, n°19.
203. Didry, N. *et al.*, « Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination », *Pharmazie*, (1993), 48: pp 301-304.
204. Sivropoulou, A. *et al.*, « Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1996), 44: pp 1202-1205.
205. Adiguzel, A. *et al.*, « Screening of antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* on foodborne bacteria and fungi », *Czech J Food Sci*, (2006), vol 25, n° 2: pp 81-89.
206. Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F. et Abdelouahid, D.E., « Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie », *Phytothérapie*, (2008), 6 : pp 153-159.
207. Shunying, Z. *et al.*, « Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum* », *Journal of Ethnopharmacology*, (2005), 96, pp 151-158.
208. Khadir, A., Bendahou, M., Benbelaid, F., Abdoune, M.A. et Abdelouahid, D.E., « Pouvoir antimicrobien de *Thymus lanceolatus* Desf., récolté en Algérie », *Phytothérapie*, (2013), 11: 353-358.
209. Chemat, S., Cherfouh, R., Meklati, B.Y. and Belanteur, K., « Composition and microbial activity of thyme (*Thymus algeriensis genuinus*) », *essential oil J Essent Oil Res*, (2012), 24: 5-11.
210. Basli, A., Chibane, M., Madani, K. et Oukil, N., « Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. », *Phytothérapie*, (2012), 10: 2-9.

211. Amarti, F., Satrani, B., Aafi, A., Ghanmi, M., Farah, A., Aberchane, M., El Ajjouri, El Antry, M.S. et Chaouch, A., « Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* du Maroc », *Phytothérapie*, 2008, 6: 342-347.
212. Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A. *and al.*, « Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol », *FEMS Microbiology Letters*, 230, (2004), 191-195.
213. Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M. *et al.*, « Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Bois. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc », *Biotechnol Agron Soc Environ*, (2010), 14(1), 141-148.
214. Oussalah, M. *et al.*, « Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E coli* O 157: H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* », *Food Control*, (2007), 18, pp 414-420.
215. Koffi, A.M., Tonzibo, Z.F., Delort, L. *et al.*, « Corrélation entre la composition chimique et l'activité antifongique des huiles essentielles à prédominance thymol sur *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* », *Phytothérapie*, (2013), 11: 134-139.
216. Aouni, M., Peten, F. et Soulimani, R., « Etude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application », *Phytothérapie*, (2013), 11: 225-236.
217. Yakhlef, G., Laoui, S., Hambaba, L., Aberkane, M.C. et Ayachi, A., « Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle », *Phytothérapie*, (2011), 9: 209-218.
218. Chebaibi, A., Rhazi, F., Amine, A. et Zerhouni, M., « Effet bactéricide (in vitro) des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum* L.) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques », *Phytothérapie*, (2011), 9: 158-164.
219. Ouraini, D., Agoumi, A., Ismaili-Alaoui, M., Cherrah, Y., Amrani, M. et Belabbas, M.A., « Etude de l'activité des huiles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des

- dermatophytes », *Phytothérapie*, (2005), Numéro 4: 147-157.
220. Atilia, I. et Djahoudi, A., « Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L'Hér.) cultivé en Algérie », *Phytothérapie*, (2015), 13: 156-162.
221. Pesavento, G., Maggini, V., Maida, I. et *al.*, « Essential oil from *Origanum vulgare* completely inhibits the growth of multidrug-resistant cystic fibrosis pathogens », *Natural Product Communications* », (2016), Vol. 11, N° 6, 861-864.
222. Pezzani, R., Vitalini, S. and Iriti, M., « Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: an update », *Phytochem Rev*, (2017), 16: 1253-1268.
223. Oussou, K.R. et *al.*, « Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne », *European Journal of Scientific Research*, (2008), vol 24, n°1, pp 94-103.
224. Eberlin, T., « Les Antibiotiques: Classification, mode d'action, utilisation thérapeutique », édition Nathan université, Paris, (1999), 128P.
225. Chebaibi, A., Marouf, Z., Rhazi-Filali, F., Fahim, M. et Ed-Dra, A., « Evaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc », *Phytothérapie*, (2016), 14: 355-362.
226. Vogel, H.G., Hock, F.J., Maas, J. and Mayer, D., « Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays », édition Springer, (2006), Germany, 889P.
227. Pradeau, D., « L'analyse pratique du médicament », édition Tec & Doc, (1999), 1068P.
228. Boukhatem, M.N., Hamaidi, M.S., Saidi, F., Hakim, Y. et Benomier, K., « Extraction, composition et valorisation de l'eau aromatique de géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) dans la dermopharmacie », *Nature et Technologie*, n°02, (2010), pages 59 à 64.
229. Bene, K., Camara, D., Soumahoro, I.A., Kanga, Y. et Zirihi, G.N., « Formulation galénique d'une pommade antimicrobienne à base d'un extrait hydroalcoolique de *Bersama abyssinica* Fresen », *Ethnopharmacologia*, (2017), n°58.
230. Tian, T., Longwu, Y., Jing, Y. and Guang, S., « Emodin, an anthraquinone derivative from *Rheum officinale* Baill, enhances cutaneous wound healing in

- rats », European Journal of Pharmacology, 567, (2007), 177-185.
231. Dakiche, H., « L'arganier (*Argania spinosa* L.): Caractérisation des principes actifs et détermination des activités biologiques et pharmacologiques », thèse de Doctorat, en Biologie spécialité Biotechnologie végétale, Université Saad Dahleb-Blida1, Blida, (2017), 155P.
232. Carlier, V., « Herbier médicinal. 35 plantes de santé à herboriser », édition Aubanel, Genève, (2005), 203P.
233. Cornillot, P., « Guide pratique des remèdes naturels », édition Selection du Reader's Digest, Paris, (1985), 334P.

PROGETS SCIENTIFIQUES

Composition chimique et propriétés antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Origanum floribundum* Munby

Chemical Composition and Antioxidant Antimicrobial Properties of *Origanum floribundum* Munby

F. Boulaghmen · C. Chaouia · F. Saidi

© Lavoisier SAS 2019

Résumé L'objectif du travail est l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle (HE) d'*Origanum floribundum* Munby, ainsi que l'évaluation de son activité antioxydante et antimicrobienne. L'analyse de la composition chimique réalisée par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier 27 composés représentant 99,8 % de la composition totale, dont le composant majoritaire est le p-cymène à 53,4 %. Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'HE ont montré qu'elle présente un large spectre d'action vis-à-vis de tous les microorganismes testés, ainsi qu'un effet bactéricide et fongicide puissant. La zone d'inhibition la plus importante ($50,67 \pm 0,58$ mm) a été observée chez *Candida albicans* et la plus faible chez *Pseudomonas aeruginosa* ($13,33 \pm 1,44$ mm). L'activité d'inhibition du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) à 600, 800 et 1 000 mg/l par l'HE est comparable à l'hydroxytoluène butylé (BHT) et au tocophérol (vitamine E), antioxydants de référence, elle reste inférieure aux concentrations de 100, 200 et 400 mg/l avec une valeur IC_{50} de $500,71 \pm 16,97$ mg/l. Le pouvoir réducteur de l'HE d'origan aux concentrations (100, 200, 400, 600, 800 et 1 000 mg/l) est légèrement inférieur aux antioxydants de référence retenus pour cette étude.

Mots clés *Origanum floribundum* · Huile essentielle · Bactéricide · Antioxydant

Abstract The aim of the work is to study the chemical composition of essential oil *Origanum floribundum* Munby and to evaluate antioxidant antimicrobial activity. The chemical composition analysis made by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) identified 27 compounds representing 99.8% of the total composition, including p-Cymene at 53.4% which is the major component. The antimicrobial activity results of essential oil illustrate that it has a broad-spectrum activity against all the microorganisms tested and a powerful bactericidal and fungicidal effect. The most important inhibition zone was $50,67 \pm 0,58$ mm at *Candida albicans* stain, and the lowest one was at *Pseudomonas aeruginosa* with $13,33 \pm 1,44$ mm. The antioxidant activity with DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) of the essential oil at 600, 800, and 1,000 mg/l has a comparable capacity with BHT (Butyl Hydroxytoluene) and tocopherol (vitamin C), reference antioxidants. It is still lower than 100, 200, and 400 mg/l concentrations with IC_{50} of $500,71 \pm 16,97$ mg/l value. The oregano essential oil reducing power at (100, 200, 400, 600, 800, and 1,000 mg/l) concentrations is slightly lower than retained reference antioxidants in this study.

Keywords *Origanum floribundum* · Essential oil · Bactericidal · Antioxidant

Introduction

La plupart des espèces végétales possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet, des avantages comparés aux médicaments qui pour la plupart ont des effets secondaires [1].

L'Algérie, de par sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs pédoclimatiques et de ressources hydriques

F. Boulaghmen (✉) · F. Saidi

Laboratoire des biotechnologies, environnement et santé, département de biologie et physiologie cellulaire, faculté des sciences de la nature et de la vie, université Blida-I, BP 270, Blida 09000, Algérie
e-mail : manel.b.2008@gmail.com

C. Chaouia

Laboratoire de biotechnologie des productions végétales, département de biotechnologie, faculté d'agronomie, université Blida-I, BP 270, Blida, Algérie

favorables au développement des plantes spontanées, notamment les plantes médicinales [2].

Les huiles essentielles (HE) extraites de ces plantes par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs. Ce sont des composés oxygénés, parfois terpénoïdes et possédant un noyau aromatique [1].

En Algérie, parmi les nombreuses plantes aromatiques et médicinales possédant d'importants pouvoirs thérapeutiques, on compte *Origanum floribundum* Munby au nom vernaculaire origan ou en arabe Zâateur. Il appartient à la famille des Lamiaceae qui compte 220 genres, appartenant à la section Elongastipica. La classification du genre établie par Ietswaart en 1980 mentionne qu'elle est endémique et rare de la région Nord centrale d'Algérie. Cette plante pousse spontanément dans les hautes montagnes de Hammam Melouane à Blida à 50 km d'Alger (Algérie).

C'est une plante à tige prostrée à la base. Les jeunes tiges sont décombantes. Elles présentent des épis lâches à fleurs disjointes après la floraison. Les fleurs sont de couleur rose, la corolle présente des pétales à lèvres sensiblement égales. Le calice bilabié possède cinq dents courtes. La plante peut atteindre ou dépasser 1 m de haut [3,4] (Fig. 1).

L'origan est une plante très utilisée en médecine populaire en raison de ses multiples effets thérapeutiques [5], notamment ses propriétés antitussive, expectorante, antimicrobienne et antioxydante [6,7].

Cette étude a pour objectif, d'une part, d'extraire et de caractériser l'HE par chromatographie, le chémotype, de déterminer les composants majoritaires et les classer en



Fig. 1 Inflorescences d'*Origanum floribundum* Munby

groupes de familles chimiques. D'autre part, ce travail permet d'évaluer son activité antimicrobienne et antioxydante.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les sommités fleuries de la plante (tiges, feuilles et fleurs) ont été récoltées au début de la floraison (juillet 2014) à partir d'une zone située dans les montagnes de la localité de Hammam Melouane de Blida Algérie. Elle englobe la partie centrale du parc de Chréa, où pousse l'espèce *Origanum floribundum* à l'état spontané. La zone se situe à une altitude de 950 m, de latitude 36°27' et de longitude de 2°52', à étage subhumide à hiver froid. Le sol est siliceux, pauvre en calcaire et matière organique [8].

L'identité, la nomenclature et la systématique de la plante ont été confirmées au niveau de l'École nationale des sciences agronomiques (Ensa) d'El-Harrach (Alger) et à l'université de Blida-I par des chercheurs du département de botanique, et ce, en comparaison avec l'identification et la description de la plante selon Quezel et Santa [3].

Extraction de l'HE

L'extraction de l'HE de la plante sèche (10 kg) a été réalisée par hydrodistillation durant une heure, avec un volume de 100 l d'eau. Un extracteur pilote « alambic semi-industriel » a été utilisé au niveau du laboratoire des HE au niveau du centre de recherche et développement (CRD SAIDAL d'Alger). La température de l'appareil est réglée à 101 ± 5 °C, afin de favoriser une grande évaporation d'eau et de l'HE sans la dénaturer. Cette méthode est recommandée par la Pharmacopée européenne [9]. La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (HE) qui est séparée de l'eau aromatique par décantation. L'HE récupérée pure est pesée, pour le calcul du rendement, puis gardée au frais à $+4 \pm 1$ °C, dans un flacon sombre et hermétiquement clos en vue de son étude et utilisation.

Étude de la composition chimique par chromatographie en phase gazeuse CG-FID

L'appareil utilisé est du modèle Hewlett-Packard 6890 GC-FID pourvu d'une colonne HP5MS (5 % polysiloxane), de longueur 30 m, de diamètre 0,25 µm avec une épaisseur du film de la phase 0,25 µm. La température est de 60 °C pendant huit minutes, augmentant à 2 °C/min vers 280 °C et maintenue constante à 280 °C pendant 15 minutes. Des échantillons dilués (1/10 hexane, v/v) de 0,2 µl ont été administrés dans le mode d'injection split avec un rapport de division de 1:25. L'injection a été réalisée à 250 °C avec un débit

de 0,5 ml/min de gaz vecteur (N₂). La détection d'ionisation de flamme a été réalisée à 320 °C. Les données quantitatives ont été acquises par voie électronique à partir des pourcentages des aires.

Analyse par CG-SM

L'analyse (CG-SM) a été effectuée avec un appareil Hewlett-Packard doté d'un chromatographe en phase gazeuse 6 890 couplé à un spectromètre de masse 5973A.

La colonne apolaire est de type HP5MS (film 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm épaisseur).

Les modalités pour les spectres CG-SM sont représentées par un gaz vecteur hélium (He) à un débit de 0,5 ml/min, injecté en mode split (1:25) à un volume de 0,2 µl à une température d'injection de 250 °C. La température du four a été programmée comme celle de la section analyse par CG-FID. Le modèle d'ionisation utilisé est à impact électronique à 70 eV sur plage de balayage de 30 à 550 unités de masse atomique.

Les composants de l'huile ont été identifiés en comparant leurs indices de rétention de Kovats obtenus en fonction d'une série de n-alcanes C₇-C₁₇ à ceux de la littérature ainsi que par comparaison de leurs spectres de masse par rapport à ceux de la littérature et ceux de la banque de spectres informatisée (Wiley 7N) [10].

Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est estimée de manière qualitative par l'évaluation des zones d'inhibition (mm), zones claires autour du disque indemne de colonies. La technique utilise des disques stériles de cellulose de 6 mm de diamètre, imbibés d'HE à tester à un volume de 15 µl, déposés sur une surface gélosée stérile, fondue et coulée aseptiquement dans une boîte de Pétri où sont diffusés les micro-organismes à tester à raison de 10⁷ à 10⁸ ufc/ml. Des disques d'antibiotiques ont été utilisés comme témoins positifs, soit le chloramphénicol (30 µg) pour les bactéries et le kétoconazole (50 µg) pour les levures, un milieu gélosé respectivement Mueller-Hinton et Sabouraud et une incubation respectivement à 37 °C pendant 24 heures et 25 °C pendant 48 heures. Il s'agit là de l'aromatogramme [9,11].

Les micro-organismes utilisés dans notre pratique sont au nombre de 11, dont neuf souches bactériennes (05 Gram⁺ et 04 Gram⁻) et deux levures. Les bactéries Gram⁺ testées sont représentées par *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Micrococcus luteus* ATCC 533 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Les bactéries Gram⁻ sont représentées par *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Escherichia coli* ATCC 4157 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Les deux levures expérimentées

dans ce travail sont *Candida albicans* ATCC 24433 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601. Ces micro-organismes sont de la collection ATCC (American Type Culture Collection) de l'unité de microbiologie du CRD SAIDAL d'Alger. La majorité des souches testées sont pathogènes pour l'homme, à l'origine de multiples infections sévères.

L'activité antimicrobienne est estimée également de manière quantitative par l'estimation de concentration minimale inhibitrice (CMI), de concentration minimale bactéricide (CMB) et de concentration minimale fongicide (CMF) sur milieu solide [12].

L'évaluation des CMI nécessite des dilutions de l'HE dans le milieu gélosé solide Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures (préalablement liquéfiés au bain Marie 95 ± 2 °C puis refroidis à 40 ± 2 °C) dans le Tween 80, à raison de 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06 et 0,03 % (v/v) puis l'inoculation de ce milieu avec les souches testées en se servant de disques absorbants. Cette méthode permet de déterminer la plus faible concentration d'HE inhibant la croissance microbienne. On continue l'expérimentation pour estimer les CMB et les CMF. La plus faible concentration de l'HE, où aucune subcroissance microbienne n'est visible, est évaluée après subculture dans un milieu sans HE à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et 25 °C pendant 48 heures pour les levures [13]. L'échelle de mesure établie par Mutai et al. [14], qui évalue l'activité antimicrobienne de l'HE, répartit la capacité antimicrobienne selon les diamètres des halos d'inhibition de multiplication microbienne en cinq groupes :

- très fortement inhibitrice, lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur ou égal à 30 mm ;
- fortement inhibitrice, lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 21–29 mm ;
- modérément inhibitrice, lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 16–20 mm ;
- légèrement inhibitrice, lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 11–15 mm ;
- peu ou non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur ou égal à 10 mm.

Activité antioxydante

L'effet antioxydant de l'HE d'*Origanum floribundum* a été évalué in vitro par deux méthodes, le pouvoir réducteur [15] et l'activité d'inhibition du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle [16,17]. Il a été estimé par comparaison avec un antioxydant de synthèse, soit l'hydroxytoluène butylé (BHT), et deux antioxydants naturels, soient l'α-tocophérol (vitamine E) et l'acide ascorbique (vitamine C).

Analyse statistique

Une analyse de la variance à un et deux facteurs (Anova 1 et 2) a été réalisée pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante, avec un niveau de signification de 0,05 en utilisant le logiciel IBM SPSS Statistics 24.0. Chaque expérimentation est répétée trois fois. Nous avons utilisé le test Newman-Keuls ($S < 0,05$) dans ce contexte.

Résultats et discussion

Rendement et composition chimique de l'HE

Un rendement en HE de $2,6\% \pm 0,1$ a été obtenu. Ce taux est légèrement inférieur à celui cité par Hazzit [10], qui est de l'ordre de 2,9 %, et supérieur à 1,6 %, rapporté par Brada et al. [18]. En effet, le rendement peut être influencé d'une part par les paramètres extrinsèques de la plante (la période de récolte, les pratiques culturales, les conditions pédo-climatiques, le séchage et les méthodes d'extraction), par les paramètres intrinsèques (la croissance et l'âge du matériel végétal) [19] et d'autre part par les facteurs abiotiques, comme l'humidité, le temps de l'insolation, la température et les vents qui influencent directement sur les espèces possédant des structures histologiques de stockage superficielles comme l'origan [20–22].

L'analyse de l'HE par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) a permis d'identifier 27 molécules représentant 99,8 % de la composition totale (Tableau 1). Le composant majoritaire est un monoterpène, le **p-cymène** avec un taux de **53,4 %**, suivi du thymol (27,8 %), du carvacrol (8,4 %), du carvacrol méthyl éther (3,9 %) et γ -terpinène avec 1,1 %. Cette identification classe *Origanum floribundum* comme une espèce à chémotype p-cymène, ce dernier a été mentionné par Daoudi-Merbah et al. [23], de la même espèce, au niveau du parc de Chréa de Blida (Algérie) avec un taux de 42,6 %, suivi des carvacrol, carvacrol méthyl éther et γ -terpinène, avec respectivement 37,0, 3,9 et 3,2 %.

Le chémotype d'*Origanum floribundum* rapporté par Ksouri et al. [24] est le thymol à 50,47 % suivi de p-cymène à 24,22 %. Le thymol comme produit majoritaire est aussi observé par Kerbouche et al., au niveau d'*Origanum floribundum* de Lakhdaria (Algérie) [25], avec un taux de 33,6 %, suivi de γ -terpinène et p-cymène, avec respectivement 19,9 et 15,5 %. Les travaux de Baser et al. montrent que le carvacrol est identifié à raison de 40 % dans *Origanum floribundum* de Blida (Algérie), suivi de linalool, p-cymène et γ -terpinène avec respectivement 16,1, 12,4 et 12,2 % [26]. Un autre chémotype γ -terpinène a été rapporté par Brada et al. [18] au niveau d'*Origanum floribundum* de Khemis-Miliana (Algérie) à raison de 34,1 %, suivi des p-

cymène à 27,6 % et carvacrol à 9,6 %. Les variations perçues dans la composition chimique des HE, d'une manière qualitative et quantitative, peuvent être liées à l'âge de la plante, à la phase du cycle végétatif, à la partie de la plante employée et/ou à certains facteurs écologiques et génétiques [27–31]. Le thymol, le carvacrol et leurs précurseurs biogénétiques (γ -terpinène et p-cymène) forment la majeure partie des HE avec une teneur de plus de 70 % [10].

Activité antimicrobienne

La croissance des bactéries et des levures testées est fortement inhibée par l'HE d'*Origanum floribundum*, dépassant largement l'activité des antibiotiques témoins positifs (Tableau 2). Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et comparés avec ceux de l'échelle de mesure de Mutai et al. [14].

La zone d'inhibition la plus élevée obtenue est celle de *Candida albicans* avec $50,67 \pm 0,58$ mm, résultat prometteur pour la thérapie contre les nombreuses infections causées par ce micro-organisme pathogène pour l'homme. La plus faible valeur de $13,33 \pm 1,44$ mm, obtenue chez *Pseudomonas aeruginosa*, n'est pas négligeable pour un micro-organisme très résistant à tout agent antimicrobien et antibiotique [32].

Les bactéries Gram⁻ se sont montrées plus résistantes aux HE d'origan que les bactéries Gram⁺ [33,34]. Cela s'explique par la présence d'une seconde membrane qui est composée de lipopolysaccharides (LPS), qui aménage une barrière vis-à-vis des HE ayant une caractéristique hydrophobe [35]. Les travaux de Zaika et de Haddouchi et Benmansour ont montré que les bactéries Gram⁻ sont généralement plus sensibles à l'action des HE [36,37].

Les résultats obtenus lors de nos expérimentations concordent avec les travaux de Deans et Ritchie et de Cosge et al. [38,39], où aucune différence significative entre la sensibilité ou la résistance des bactéries Gram⁻ et celle des bactéries Gram⁺ n'est observée.

Selon la littérature, *Pseudomonas aeruginosa* est très résistante à toute source antimicrobienne et antibiotique. Cette résistance est liée à sa capacité d'établir une disposition complexe, constituée de strates distinctes formant un biofilm. Il a été mentionné que le traitement de telles bactéries nécessiterait de grandes concentrations d'agents antimicrobiens [32]. Lors de nos essais, elle s'est révélée sensible à l'action d'HE d'*Origanum floribundum*, avec l'obtention de faibles zones d'inhibition de $13,33 \pm 1,44$ mm mais qui reste non négligeable. Cosge et al. et Bendahou et al. [39,40] soulignent que ce sont les composés phénoliques qui attribuent aux HE une activité antimicrobienne puissante, comme le thymol, le carvacrol, le carvacrol méthyl éther et leurs précurseurs biogénétiques qui sont γ -terpinène et p-cymène.

Tableau 1 Composition de l'huile essentielle d' <i>Origanum floribundum</i> Munby en pourcentage (%)				
N°	Composés	Indice de rétention (IR)	% du composant	Identification
1	α -thujène	927	0,2	IR-SM
2	α -pinène	936	0,7	IR-SM-Et
3	Camphène	950	0,1	IR-SM-Et
4	β -pinène	978	0,1	IR-SM-Et
5	1-octen-3-ol	980	0,2	IR-SM
6	β -myrcène	989	0,3	IR-SM-Et
7	α -phellandrène	1 004	t	IR-SM-Et
8	δ -3-carène	1 011	t	IR-SM-Et
9	α -terpinène	1 017	0,3	IR-SM-Et
10	p-cymène	1 024	53,4	IR-SM-Et
11	γ -terpinène	1 060	1,1	IR-SM-Et
12	Linalooloxide	1 075	0,1	IR-SM
13	Terpinolène	1 087	t	IR-SM-Et
14	p-cyménène	1 088	0,2	IR-SM
15	Linalool	1 099	0,6	IR-SM-Et
16	4-terpinéol	1 077	0,7	IR-SM-Et
17	p-cymène-8-ol	1 184	0,6	IR-SM
18	Thymol méthyl éther	1 234	0,4	IR-SM
19	Carvacrol méthyl éther	1 243	3,9	IR-SM
20	Thymoquinone	1 260	t	IR-SM
21	Thymol	1 290	27,8	IR-SM-Et
22	Carvacrol	1 300	8,4	IR-SM-Et
23	β -caryophyllène	1 420	0,1	IR-SM
24	β -bisabolène	1 508	t	IR-SM
25	γ -cadinène	1 513	t	IR-SM
26	Cis-calaménène	1 523	t	IR-SM
27	Caryophyllénéoxide	1 581	0,6	IR-SM
	Composés identifiés (%)		99,8	
	Monoterpènes		56,4	
	Monoterpènes oxygénés		42,5	
	Sesquiterpènes		0,1	
	Sesquiterpènes oxygénés		0,6	
	Autres		0,2	

Composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne HP5MS ; t : trace (<0,05 %). Identification / *Components classified in the order of elution on HP5 MS column; t: trace (< 0,05%). Identification.* IR = comparaison de l'indice de rétention calculé par rapport à ceux de la littérature / *RI = comparison of retention index with bibliography.* SM = comparaison du spectre de masse à ceux des spectres des bibliothèques informatisées (Wiley 7N et NIST 2005) du logiciel d'identification ainsi que ceux de la littérature / *MS = comparison of mass spectra with MS libraries and mass spectra of literature data.* Et : comparaison des indices de rétention par rapport à ceux des composés purs (étalons) disponibles dans le laboratoire d'analyse. Les indices de rétention sont calculés par rapport à une série d'alcane C₈-C₂₈ injectés dans les mêmes conditions que l'huile étudiée [10] / *Et = comparison of retention index with pure compounds available in analysis laboratory. The retention index is calculated relative to n-alkanes C₈-C₂₈ co-injection in the same condition as oil*

Les résultats de l'analyse statistique des diamètres des zones d'inhibition comme variables ont mis en évidence une différence significative entre les souches microbiennes testées (test Newman-Keuls) et (Anova 1, S < 0,05). Cette

analyse a permis de classer les souches selon leur sensibilité comme suit :

Candida albicans > *Klebsiella pneumoniae* ; *Bacillus cereus* ; *Bacillus subtilis* > *Staphylococcus aureus* >

Tableau 2 Activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Origanum floribundum* sur milieu solide

Souches microbiennes ^a Source	Diamètre de la zone d'inhibition ^b			Les concentrations CMI, CMB et CMF de l'HE vis-à-vis des souches étudiées en % (v/v)				Interprétation
	ATCC	Gram	HE <i>Origanum floribundum</i>	Cp ^c	CMI	CMB ou CMF	CMB/CMI ou CMF/CMI	
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	39,67 ± 2,08	30,00 ± 1,00	0,125	0,5	4,00	Bactériostatique
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	35,00 ± 2,00	21,33 ± 0,58	0,25	1,00	4,00	Bactériostatique
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	26,00 ± 1,00	31,33 ± 0,58	0,5	0,5	1,00	Bactéricide
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	27,00 ± 1,00	26,00 ± 1,73	0,5	1,00	2,00	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	44,00 ± 2,64	26,33 ± 1,53	0,06	0,125	2,08	Bactéricide
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	-	36,00 ± 1,73	/	0,25	0,25	1,00	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	34,67 ± 1,53	28,33 ± 0,58	0,25	0,25	1,00	Bactéricide
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	46,00 ± 1,00	28,67 ± 0,58	0,06	0,25	4,17	Bactériostatique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	13,33 ± 1,44	08,33 ± 0,58	1,00	1,00	1,00	Bactéricide
<i>Candida albicans</i>	24433	/	50,67 ± 0,58	37,67 ± 1,53	0,03	0,06	2,00	Fongicide
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	/	35,33 ± 0,58	30,67 ± 0,58	0,25	1,00	4,00	Fongistatique

HE *Origanum floribundum* : huile essentielle d'*Origanum floribundum* / EO: *Origanum floribundum* essential oil ; CMI : concentration minimale inhibitrice (en % v/v) / MIC: minimum inhibitory concentration (as % v/v) ; CMB : concentration minimale bactéricide (en % v/v) / MBC: minimum bactericidal concentration (as % v/v) ; CMF : concentration minimale fongicide (en % v/v) / MFC: minimum fungicidal concentration (as v/v)

^a Densité finale bactérienne de 10⁷ à 10⁸ ufc/ml / Final bacterial density was of 10⁷ to 10⁸ C.fu/ml

^b Diffusion en mm par disque ± écarts-types avec trois répétitions / Diffusion in mm per disc ± standard deviations with three replicates

^c Cp : contrôle positif chloramphénicol (30 µg/disque) pour les bactéries et kétoconazole (50 µg/disque) pour les levures / Pc: positive control chloramphenicol (30 µg/disc) for bacteria and ketoconazole (50 µg/disc) for yeasts

Saccharomyces cerevisiae > *Micrococcus luteus* > *Enterococcus faecium* > *Escherichia coli* > *Bordetella bronchiseptica* > *Pseudomonas aeruginosa*.

L'HE d'*Origanum floribundum* a une importante activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries et levures testées. Toutes les souches sont inhibées à des concentrations allant de 0,03 à 1 % (v/v). L'activité la plus élevée est celle de *Pseudomonas aeruginosa* (1,00 %), la plus faible étant celle de *Candida albicans* (0,03 %) (Tableau 2), ce qui correspond aux zones d'inhibition, car les CMI sont inversement proportionnelles aux diamètres des zones d'inhibition [41].

Les valeurs les plus élevées des CMB/CMF de l'HE d'origan 1 % (v/v) sont enregistrées chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* et *Bacillus cereus*. Les valeurs les plus faibles, de 0,06 % (v/v), sont obtenues chez *Candida albicans*.

Les taux obtenus des CMI et CMB ou CMF varient d'un micro-organisme à un autre. Dans certains cas, elles sont égales comme celles retrouvées dans nos résultats (Tableau 2), ce qui dénote une forte action bactéricide et/ou fongicide. En effet, lorsque le rapport CMB/CMI et/ou CMF/CMI est supérieur ou égal à 4, l'HE est bactériostatique et/ou fongistatique [42]. Lorsque le rapport CMB/CMI et /ou CMF/CMI est inférieur à 4, l'HE est dite bactéricide et/ou fongicide.

Le tableau 2 révèle que l'HE d'*Origanum floribundum* a un effet bactéricide sur six bactéries parmi les neuf testées et fongicide sur une levure parmi les deux testées. Nous pou-

vons conclure que l'HE a révélé une bonne activité à la fois bactéricide et fongicide. Cette activité favorise son emploi comme produit pharmaceutique.

Activité antioxydante au DPPH

Les résultats de l'effet antioxydant vis-à-vis du radical DPPH par l'HE d'origan, ainsi que ceux du BHT et du tocophérol sont mentionnés sur la figure 2.

L'HE présente une activité de piégeage du radical stable DPPH, puisqu'elle est capable de réduire la forme stable du radical (couleur violette) vers le diphénylpicrylhydrazine (coloration jaune).

L'activité antioxydante de l'HE d'origan étudiée, du BHT et du tocophérol augmente proportionnellement avec la concentration. Elle est de 18,27 % pour la concentration de 100 mg/l et atteint le seuil de 80,79 % à la concentration 800 mg/l. L'HE présente une capacité de réduction du radical DPPH comparable à celle des antioxydants de référence à partir des concentrations 600 mg/l avec un taux de 71,16 %. À la concentration 800 mg/l, nous enregistrons 80,79 %, dépassant ainsi le taux du tocophérol qui est de 78,4 %, mais reste légèrement inférieure au BHT, où le taux est plus élevé avec 88,8 % (Fig. 2). L'activité de l'HE peut être due à sa forte teneur en p-cymène et thymol, ce dernier est un composé phénolique capable de piéger les radicaux libres grâce aux groupements hydroxyles présents dans sa

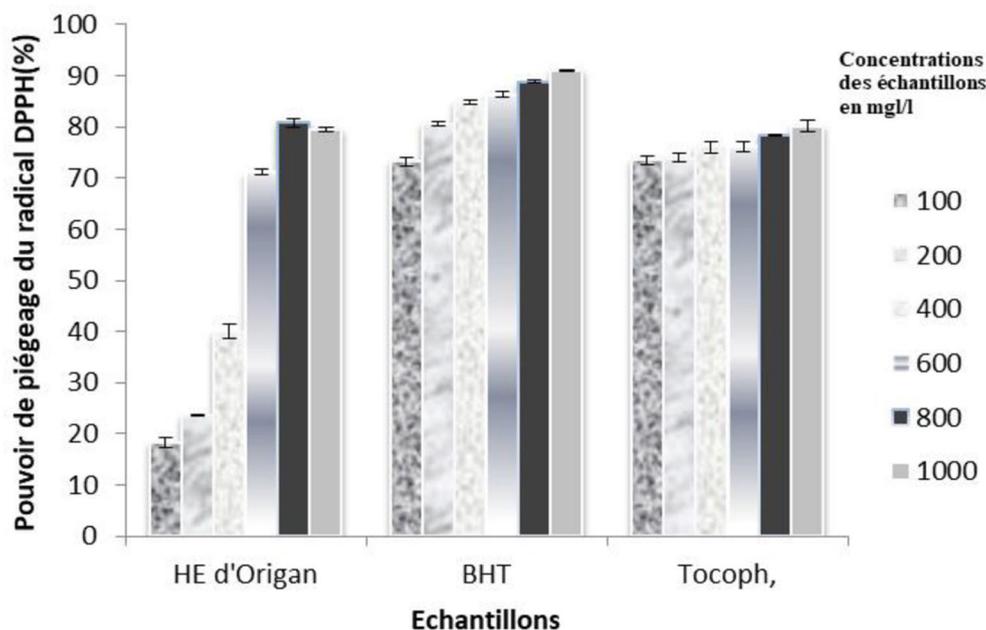


Fig. 2 Résultats du piégeage du radical DPPH par l'huile essentielle d'*Origanum floribundum*, le BHT et le tocophérol. HE : huile essentielle / EO: essential oil ; DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle / DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ; BHT : hydroxytoluène butylé / BHT: butyl hydroxy Toluene ; Tocoph : tocophérol / tocopherol

structure chimique. Plusieurs travaux indiquent que les composés phénoliques jouent un rôle important dans l'extraction des radicaux libres. En plus du p-cymène, nous retrouvons le thymol, le carvacrol, le γ -terpinène, le carvacrol méthyl éther et le thymol méthyl éther. Tous ces composants d'HE d'origan pourraient exercer, à côté d'autres composés mineurs, un effet de synergie entre eux et induiraient une activité antioxydante plus importante [43–47].

La valeur IC_{50} déterminée en mg/l exprime la concentration inhibitrice de 50 % des molécules de DPPH mises en solution. Une faible valeur en IC_{50} entraîne automatiquement une grande activité en DPPH. L' IC_{50} de l'HE d'origan a été évaluée à $500,71 \pm 16,97$ mg/l, tandis que celle du BHT est égale à $23,73 \pm 0,27$ mg/l. Ce résultat est inférieur à l' IC_{50} de la même espèce d'origan provenant de Lakhdaria [24], de l'ordre de $250 \pm 1,5$ μ g/ml, et supérieur à $521,1 \pm 18,0$ mg/l d'origan de Hammam Melouane rapporté par Hazzit et al. [48]. En effet, cette différence peut être expliquée par la différence dans la composition chimique de l'HE, les composés phénoliques comme le thymol et le cavacrol favorisant plus l'activité vis-à-vis du DPPH.

L'étude statistique (Anova 2) nous a permis de mettre en évidence l'effet significatif de la nature de l'antioxydant (HE, BHT et tocophérol) et de la concentration sur le pouvoir de piégeage du radical DPPH ; le test de Newman-Keuls nous a permis de classer ces variables selon leurs activités de piégeage du DPPH croissantes, soit BHT > tocophérol > HE de façon concentrations-dépendantes (de 100, 200, 400, 600, 800 à 1 000 mg/l).

Activité du pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur mesure l'aptitude des HE d'*Origanum floribundum* à agir en tant que donneur d'électrons et réagir avec les radicaux libres en les stabilisant, mettant ainsi fin aux réactions radicalaires en chaîne. Dans l'activité du pouvoir réducteur, la présence d'antioxydants dans

l'HE entraînerait la réduction du fer Fe^{3+} en Fe^{2+} . Les BHT, tocophérol et acide ascorbique ont été utilisés comme antioxydants de référence, avec une absorbance à 700 nm (Tableau 3).

Une quantité de Fe^{2+} complexe peut alors être suivie en mesurant la formation du bleu de Prusse $Fe_4(Fe(CN)_6)_3$ à 700 nm des pouvoirs réducteurs des huiles extraites d'origan et des composés de références tocophérol, BHT et acide ascorbique en fonction des concentrations des échantillons. Les résultats obtenus sont nettement plus faibles que ceux du tocophérol et du BHT, néanmoins, l'huile d'origan a donné des valeurs d'absorbance de 1,39, 1,4 et 1,47, similaires à celles de l'acide ascorbique respectivement de 1,55, 1,61 et 1,71 dans la gamme des concentrations 600, 800, 1 000 mg/l.

Nous constatons que l'HE d'origan a un pouvoir réducteur qui augmente avec la concentration, comparable à l'acide ascorbique et inférieur au BHT et au tocophérol.

L'analyse statistique montre que l'interaction des variables étudiées (nature de l'antioxydant et concentrations) a un effet significatif sur le pouvoir réducteur. Le test de Newman-Keuls a permis de les classer selon leurs pouvoirs réducteurs croissants, soit BHT > tocophérol > vitamine C (acide ascorbique) > HE de façon concentrations-dépendantes (de 100, 200, 400, 600, 800 à 1 000 mg/l).

Conclusion

L'HE extraite d'*Origanum floribundum* Munby de la localité de Hammam Melouane (Algérie) présente un rendement de $2,6 \pm 0,1$ %. Il est obtenu par hydrodistillation à l'échelle semi-industrielle.

La caractérisation de cette HE d'*Origanum floribundum* par CG/SM nous a permis l'identification de 27 molécules qui représentent 99,8 % de la composition totale. Le chémotype est le p-cymène à **53,4** %, suivi du thymol, du carvacrol,

Tableau 3 Test du pouvoir réducteur de l'huile essentielle d'*Origanum floribundum*, du tocophérol, du BHT et de l'acide ascorbique

Concentration (mg/l)	Absorbance à 700 nm ^a			
	HE d'origan	Tocophérol	BHT	Acide ascorbique
100	0,57 \pm 0,026	0,87 \pm 0,013	1,43 \pm 0,02	1,34 \pm 0,043
200	0,86 \pm 0,055	1,55 \pm 0,037	1,66 \pm 0,056	1,43 \pm 0,013
400	1,26 \pm 0,053	1,79 \pm 0,043	1,75 \pm 0,056	1,49 \pm 0,019
600	1,39 \pm 0,01	1,94 \pm 0,047	1,81 \pm 0,025	1,55 \pm 0,054
800	1,40 \pm 0,006	1,98 \pm 0,003	1,80 \pm 0,027	1,61 \pm 0,027
1000	1,47 \pm 0,017	2,03 \pm 0,01	1,98 \pm 0,014	1,71 \pm 0,011

^a Les résultats sont en moyenne \pm écart-type de trois mesures / The results correspond to average of three replicates \pm standard deviations

du carvacrol méthyl éther et du γ -terpinène avec respectivement 27,8, 8,4, 3,9 et 1,1 %.

Les tests de l'activité antimicrobienne réalisés montrent que les HE possèdent un large spectre d'action vis-à-vis de tous les micro-organismes. Il n'y a pas de distinction significative entre la sensibilité des bactéries Gram⁻ et celle de Gram⁺.

Les composés phénoliques attribuent aux HE d'origan une forte activité antimicrobienne comme le thymol, le carvacrol, le carvacrol méthyl éther et leurs précurseurs biogénétiques qui sont p-cymène et γ -terpinène qui engendrent une synergie entre leurs faits, qui élèveraient l'activité antimicrobienne.

L'effet antimicrobien indique que l'HE étudiée possède un large spectre d'action vis-à-vis de presque toutes les bactéries et levures testées, c'est donc une HE bactéricide et fongicide par sa richesse en p-cymène précurseur biogénétique des composés phénoliques, en thymol et en carvacrol, ce qui suggère une possible exploitation dans le domaine pharmacologique.

L'estimation de la CMI et CMB/CMF a montré que l'HE d'origan a un pouvoir bactéricide sur six bactéries parmi les neuf testées et un pouvoir fongicide pour *Candida albicans*.

L'HE étudiée possède une activité antioxydante nette, mais qui reste globalement inférieure à celle des témoins positifs utilisés.

L'activité antioxydante au DPPH de l'HE, du BHT et du tocophérol révèle que l'HE d'origan présente une capacité de réduction du radical DPPH, comparable à celle du tocophérol et du BHT à partir des concentrations 600 mg/l.

L'HE montre aussi un pouvoir réducteur, proportionnel à la concentration des essais et témoins. Il est légèrement inférieur en comparaison avec ceux de l'acide ascorbique, du BHT et du tocophérol.

La recherche sur les oxyradicaux et les antioxydants est parfaitement d'actualité, car de nombreux mécanismes bio-radicalaires restent encore à préciser aussi bien in vitro qu'in vivo.

Remerciements Nous remercions le Pr Nouas M., directeur général du groupe SAIDAL, de nous avoir permis d'effectuer des manipulations au niveau du Centre de recherche et développement (CRD) d'Alger.

Nos remerciements s'adressent également au Pr Hazzit M. du laboratoire de technologie alimentaire de l'École nationale supérieure agronomique (Ensa) d'Alger pour son aide et encouragement

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- Iserin P (2001) Encyclopédie des plantes médicinales. Édition Larousse, Paris, 335 p
- Beloued A (2012) Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires, Alger, 284 p
- Quezel P, Santa S (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques, Tome II. Édition du Centre national de la recherche scientifique, Paris, 600 p
- Ietswaart JH (1980) A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae), volume 4. Editor Leiden botanical series, Boston, 153 p
- Carlier V (2005) Herbarium médicinales : 35 plantes de santé à herboriser. Édition Aubanel, Genève, 203 p
- Cornillot P (1985) Guide pratique des remèdes naturels. Édition Sélection du Reader's Digest, Paris, 334 p
- Bruneton J (1999) Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. Édition Tec & Doc, Paris, 585 p
- Hamimeche M (2007) Relation végétation-avifaune dans le secteur Est (Hammam Melouane) du Parc national de Chréa (Wilaya de Blida), thèse de magister en sciences agronomiques option biodiversité et biotechnologies végétales. Institut national agronomique, El Harrach-Alger, 116 p
- Anonyme (2008) Pharmacopée européenne, 6^e édition, 3538 p
- Hazzit M (2008) Étude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de thym et d'origan poussant en Algérie, thèse de doctorat en chimie. Université des sciences et de la technologie Houari-Boumediène, Alger, 204 p
- Chikhoun A (2007) Huiles essentielles de thym et d'origan, thèse de magister en agronomie option sciences alimentaires. Institut national agronomique El Harrach, Alger, 178 p
- Courvalin P, Leclercq R, Bongen E (2012) AntibioGramme. 3^e édition, Édition ESKA, Paris, 800 p
- Mebarki N (2010) Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanessi* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne, thèse de magistère en génie des procédés chimiques et pharmaceutiques, option industrie pharmaceutique. Université M'hamed-Bougara, faculté des hydrocarbures et de la chimie, Boumerdes, 185 p
- Mutai C, Bii C, Vagias C, et al (2009) Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *J Ethnopharmacol* 123:143–8
- Oyaizu M (1986) Studies of product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr* 44:307–15
- Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O (1997) Iridoid glycosides with free radical scavenging properties from *Fagraeablumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80:1144–52
- Burits M, Bucar F (2001) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res* 14:323–28
- Brada M, Saadi A, Wathlet JP, et al (2012) The essential oils of *Origanum floribundum* Munby in Algeria. *J Essent Oil Bear Pl* 15(3):497–502
- Sellami IH, Maamouri E, Chahed T, et al (2009) Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Ind Crop Prod* 30:395–402
- El Ouali Lalam A, El Akhal F, Ouedrhiri W, et al (2013) Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre Nord marocain: *Thymus vulgaris* et *Thymus satureioidis*. *Les technologies de laboratoire* 8(31):27–33
- Aberchane M, Fechtal M, Chaouch A, et al (2001) Influence de la durée et de la technique d'extraction sur le rendement et la qualité des huiles essentielles du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica manetti*). *Annales de la recherche forestière au Maroc* 34:110–18

22. Bourkhiss M, Hnach M, Bourkhiss B, et al (2009) Effet du séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agro-solutions* 20:44–8
23. Daoudi-Merbah F, Hazzit M, Dahmani-Megrerouche M (2016) Influence of morphological variability and habitat on the chemical composition of essential oil of an Algerian endemic *Origanum* species (*Origanum floribundum* Munby). *Chem Biodivers* 13:1088–94
24. Ksouri S, DjebirS, Bentorki A, et al (2017) Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L and *Thymus ciliatus* Desf against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. *J Mycol Med* 27:245–9
25. Kerbouche L, Hazzit M, Ferhat MA, et al (2015) Biological activities of essential oils and ethanol extracts of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq and *Origanum floribundum* Munby. *J Essent Oil Bear Pl* 18:1197–1208
26. Baser KHC, Kürkçüoğlu M, Houmani Z, et al (2000) Composition of the essential oil of *Origanum floribundum* Munby from Algeria. *J Essent Oil Res* 12:753–6
27. Senatore F (1996) Influence of harvesting time on yield and composition of essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J Agric Food Chem* 44:1327–32
28. Kokkini S, Karousou R, Dardiota A, et al (1997) Autumn essential oils of *Greek oregano*. *Phytochemistry* 44:883–6
29. Russo M, Galletti GC, Bocchini P, et al (1998) Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. *Influences*. *J Agric Food Chem* 46:3741–6
30. Thompson JD, Chalchat JC, Michet A, et al (2003) Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J Chem Ecol* 29:859–80
31. Karousou R, Karousou R, Koureas DN, et al (2005) Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Photochemistry* 66:2668–73
32. Pibiri MC (2006) Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, thèse de doctorat. École polytechnique fédérale de Lausanne, Suisse, 177 p
33. Billerbeck VG, Roques C, Vanrière P, et al (2002) Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes* X:248–51
34. Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras, T, et al (1995) Antimicrobial activity of mint essential oils. *J Agric Food Chem* 43:2384–8
35. Prescott LM, Harley JP, Klein DA (2003) *Microbiologie*. Édition de Boeck & Larcier, s.a., Bruxelles, 1137 p
36. Haddouchi F, Benmansour A (2008) Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Les technologies de laboratoire* 3(8):20–27 (janvier–février)
37. Zaika LL (1988) Spices and herbs-their antimicrobial activity and its determination. *J Food Saf* 9:97–118
38. Deans SG, Ritchie G (1987) Antibacterial properties of plant essential oils. *J Food Microbiol* 5:162–80
39. Cosge B, Turker A, Ipek A, Gurbuz B (2009) Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Ietswaart, an endemic species to Turkey. *Molecules* 14:1702–12
40. Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, et al (2007) Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *Food Chem* 106:132–9
41. Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Abdelouahid DE (2008) Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie* 6:153–9
42. Oussou KR, Yolou S, Boti JB, et al (2008) Étude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la Pharmacopée ivoirienne. *Eur J Sci Res* 24:94–103
43. Shariffar F, Moshafi MH, Mansouri SH, et al (2007) In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 18:800–5
44. Bouhdid S, Skali SN, Idaomar M, et al (2008) Antibacterial and antioxydant activities of *Origanum compactum* essential oil. *Afr J Biotechnol* 7:1563–70
45. Bektas E, DafereraD, Sokmen M, et al (2016) In vitro antimicrobial, antioxidant and antiviral activities of the essential oil and various extracts from *Thymus nummularis* M. Bieb. *Indian J Tradit Know* 15:403–10
46. Loizzo MR, Menichini F, Conforti F, et al (2009) Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chem* 117:174–80
47. Vazirian M, Mohammadi M, Farzaei MH, et al (2015) Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* subsp. *Vulgare* essential oil from Iran. *Res J Pharmacogn* 2:41–6
48. Hazzit M, Baaliouamer A, Faleiro ML, et al (2006) Composition of the essential oil of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *J Agric Food Chem* 54:6314–21

COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE D'HUILE ESSENTIELLE EXTRAITE DE *THYMUS GUYONII* DE NOÉ D'AFLOU - ALGÉRIE

BOULAGHMEN Faiza^{1*}, CHAOUIA Cherifa¹, HAZZIT Mohamed², NOUAS Mohamed³ et SAIDI Fairouz¹

1. Université Blida1 BP 270 Blida 09000 - Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Département de Biologie et Physiologie Cellulaire - Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé, Algérie
2. Ecole National des Sciences Agronomiques (ENSA) 16200 El-Harrach, Alger- - Département de Technologie des Industries Agricoles et Alimentaires - Laboratoire de chimie, Algérie
3. Institut Pasteur d'Algérie Dely Ibrahim 16000, Alger-Laboratoire de contrôle de qualité, Algérie

Reçu le 21/12/2017, Révisé le 02/06/2018, Accepté le 05/06/2018

Résumé

Description du sujet : *Thymus guyonii* de Noé est une plante médicinale, aromatique et endémique de l'Algérie. Elle appartient à la famille des Lamiaceae de la classe Dicotylédones et de sous classe Asteridae. Elle est appelée Zaitra.

Objectifs : Notre travail consiste à étudier l'huile essentielle de *Thymus guyonii* par sa composition chimique. Evaluer l'activité biologique de l'huile essentielle telle que l'effet antimicrobien.

Méthodes : L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation sur les parties aériennes de la plante. Puis la composition chimique a été accomplie par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). L'effet antimicrobien a été effectué sur des bactéries Gram +, Gram - et des levures. La méthode utilisée est l'aromatogramme avec détermination des concentrations minimale inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF).

Résultats : L'huile essentielle de *Thymus guyonii* a été identifiée par CG/SM à 98,2% de sa composition totale. Le composé majoritaire est le thymol à 35,8% suivi du γ -Terpinène à 18,7% et le p-Cymène à 15,5%. L'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* a révélé un diamètre d'inhibition le plus important (64,00±2,00 mm) chez *Candida albicans* et le plus faible chez *Pseudomonas aeruginosa* de 22,00 ± 0,00 mm. L'huile essentielle est bactéricide sur toutes les bactéries et fongicide sur les levures testées.

Conclusion : Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de *Thymus guyonii* d'Aflou a un large spectre d'action vis à vis de tous les microorganismes testés ainsi qu'un effet bactéricide et fongicide puissant.

Mots clés : *Thymus guyonii* ; huile essentielle ; thymol ; CG/SM ; activité antimicrobienne.

CHEMICAL COMPOSITION AND MICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL EXTRACT FROM *THYMUS GUYONII* DE NOÉ FROM AFLOU ALGERIA

Abstract

Description of the subject: *Thymus guyonii* de Noé is medicinal aromatic endemic Algerian plant. Belonging to Labiatae family of Dicotyledonous class and Asteridae under class, commonly called Zaitra.

Objective: Our work consists of studying *Thymus guyonii* essential oil by its chemical composition, evaluate the biological activity essential oil such as the antimicrobial effect.

Methods: Hydrodistilled aerial part plant essential oil was done by semi pilote and analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). Antimicrobial activity was done on Gram-, Gram+ bacterium and yeast by using aromatogram method with determination minimum inhibitory concentration (MIC), minimal bacteridal concentration (MBC) and fungicidal (MFC).

Results: The essential oil of *Thymus guyonii* was identified by GC / MS at 98.2% of its total composition. The major component is thymol at 35.8% followed by γ -Terpinene at 18.7% and p-Cymene at 15.5%. The study of the antimicrobial activity of *Thymus guyonii* essential oil showed that the most important inhibition diameter was 64.00±2.00mm at *Candida albicans* stain, the lowest one was at *Pseudomonas aeruginosa* with 22.00±0.00mm. Essential oil is bacteridal on bacteria and fungicidal on yeasts studied.

Conclusion: The results obtained showed that *Thymus guyonii* essential oil of Aflou has a broad-spectrum activity against all the microorganisms tested with powerful bactericidal and fungicide effect.

Key words: *Thymus guyonii* de Noé ; essential oil ; Thymol; GC/MS; antimicrobial activity.

*Auteur correspondant : BOULAGHMEN Faiza, E-mail : manel.b.2008@gmail.com

INTRODUCTION

Thymus appartient à la famille des Lamiacées qui compte 220 genres. Il est l'un des huit importants genres. Plusieurs espèces du thym poussent largement dans le vieux continent et la région ouest de la méditerranée qui est le centre où pousse le genre *Thymus* [1]. Parmi les 11 espèces de thym qui poussent en Algérie on trouve *Thymus guyonii* de Noé qui est une espèce rare et endémique au niveau du nord du Sahara Algérien [2]. C'est une plante à petites feuilles ovoïdes d'environ 5 mm dont le calice est glabre. Ses fleurs sont blanches et petites (5-6 mm) portées en inflorescences courtes. Ses tiges sont plus ou moins prostrées et rampantes. Son nom vernaculaire est «*zaitra*» et il est utilisé en médecine traditionnelle par les populations locales, comme expectorant, antitussif, antibroncholitique et comme puissant antimicrobien [3] et [4].

Le but de ce travail consiste en la détermination de la composition chimique, déterminer les composés majoritaires, le chémotype et les classer en groupes de familles chimiques. L'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* s'est faite par la mesure des zones d'inhibition (méthode qualitative) et par la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI), ainsi que les Concentrations Minimales Bactéricides / Fongicides (CMB / CMF) sur milieu solide (méthode quantitative).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Les parties aériennes du thym ont été récoltées au mois de Juin 2014, au niveau des montagnes de Sidi Bouzid Aflou Wilaya de Laghouat. La région se situe à 400Km d'Alger, elle se trouve à une altitude de 1267m, une latitude 34°20'59" et une longitude 2°15'43" [5]. *Thymus guyonii* de Noé a été identifié par comparaison au spécimen déjà déposé à la maison de l'herbier (herbarium) de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-harrach (ENSA) et l'identité de l'espèce a été confirmée par les professeurs du département de botanique de l'école précédemment citée.

2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation à l'aide d'un extracteur pilote «Alambic semi industriel» pendant une heure, au niveau du laboratoire des huiles essentielles (CRD SAIDAL d'El-Harrach). La quantité de 10Kg de matière végétale sèche a été utilisée avec un volume de 100 litres d'eau. La température de l'appareil est réglée à 101°±5°C, pour favoriser un maximum d'évaporation de l'eau et de l'huile essentielle sans la détruire. Cette méthode est préconisée par la pharmacopée Européenne [6]. L'huile essentielle est récoltée et pesée pour le calcul du rendement, puis conservée au frais à +4°C±1, dans un flacon ombrée et hermétiquement clos. Cette huile essentielle sera étudiée et analysée. Le rendement a été calculé selon la formule:

$R\% = (MHE/MVS) \times 100$. MHE: masse de l'huile essentielle et MVS: masse de la matière végétale sèche. Les deux masses sont exprimées dans la même unité.

3. Etude de la composition chimique par chromatographie CG-FID et CG/SM

3.1. Analyse par CG-FID

L'appareil utilisé est du type Hewlett-Packard 6890 GC-FID équipé d'une colonne HP5MS (5% polysiloxane), longueur: 30m, diamètre: 0,25µm avec une épaisseur du film de la phase 0,25 µm. Le programme de température était de 60°C pendant 8 min, augmentant à 2°C/min vers 280°C et maintenu à 280°C pendant 15 min. Des échantillons dilués (1/10 hexane, v/v) de 0,2 µl ont été injectés dans le mode d'injection split avec le rapport de division de 1:25. L'injection a été réalisée à 250°C. Un débit de 0,5 ml/min de gaz vecteur (N₂) a été utilisé. La détection d'ionisation de flamme a été effectuée à 320°C. Les données quantitatives ont été obtenues par voie électronique à partir des pourcentages des aires.

3.2. Analyse par CG-SM

L'analyse (CG-SM) a été réalisée avec un appareil informatisé Hewlett-Packard comprenant un chromatographe en phase gazeuse 6890 couplé à un spectromètre de masse 5973A en utilisant la colonne apolaire HP5MS (film 30m × 0,25mm × 0,25µm épaisseur).

Les conditions pour les spectres CG-SM étaient : Helium (He) en tant que gaz vecteur à un débit de 0,5 ml/min; mode d'injection split (1:25); volume injecté 0,2 µl (1/10 dans l'hexane, v/v) ; et 250°C comme température d'injection. Le programme de température du four est décrit ci-dessus dans la section analyse par CG-FID. Un mode d'ionisation avec un impact électronique à 70eV a été utilisé sur une plage de balayage de 30 à 550 unités de masse atomique.

3.3. Identification des composés de l'huile essentielle

Les constituants de l'huile ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention de Kovats déterminés par rapport à une série de n-alcanes C₇-C₁₇ avec ceux de littérature ainsi que par comparaison de leurs spectres de masse par rapport à ceux de la banque de spectres informatisée (Wiley 7N) et ceux de la littérature [7].

4. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est évaluée de manière qualitative par la détermination des zones d'inhibition (mm) qui sont des zones claires autour du disque indemne de colonies. La méthode utilise des disques stériles de cellulose (diamètre : 6mm) imprégnés d'huile essentielle à tester. Ils sont déposés sur une surface gélosée stérile, fondue et coulée aseptiquement dans une boîte de Pétri où sont ensemencés les microorganismes à tester à raison de 10⁷ à 10⁸ germes/ml. Le milieu gélosé utilisé pour les bactéries est Muller-Hinton et celui des levures est Sabouraud. Et l'incubation se fait à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures. Cette méthode est appelée aromatochrome [6] et [8]. Les microorganismes utilisés dans notre expérimentation sont en nombre de 11 dont 09 souches bactériennes (05 Gram+ et 04 Gram-) et 02 levures. Les bactéries Gram+ testées sont *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Micrococcus luteus* ATCC 533 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Les bactéries Gram- sont *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Escherichia coli* ATCC 4157, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Candida albicans ATCC 24433 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 sont les deux levures testées dans notre expérimentation. Ces microorganismes appartiennent à la collection ATCC (American type culture collection) du laboratoire de microbiologie du (CRD SAIDAL d'El Harrach). A part *Saccharomyces cerevisiae* qui est une souche non pathogène, toutes les autres souches étudiées sont pathogènes pour l'homme lui causant de nombreuses infections graves.

L'activité antimicrobienne est aussi évaluée de manière quantitative par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), concentration minimale bactéricide (CMB) et concentration minimale fongicide (CMF) sur milieu solide [9].

Pour déterminer les CMI, il s'agit d'effectuer une série de dilutions de l'huile essentielle dans le milieu gélosé solide Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures en utilisant du tween 80, les milieux de culture sont liquéfiés au bain marie (95°±2°C) puis refroidis à 40°±2°C. Les dilutions préparées sont de 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,06%, 0,03% (v/v). Puis inoculer ces milieux avec les souches testées en utilisant des disques absorbants. Grâce à ces dilutions nous pouvons déterminer la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant la croissance microbienne. On poursuit l'expérimentation pour déterminer les CMB et CMF. Ensuite la plus faible concentration de l'huile essentielle, où aucune sub-croissance microbienne n'est visible est déterminée après subculture dans un milieu indemne d'huile essentielle à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures [10].

L'estimation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est basée sur une échelle de mesure. Qui classe le pouvoir antimicrobien en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 5 classes [11].

- Très fortement inhibitrice, lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est ≥ 30mm.
- Fortement inhibitrice, lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 21-29mm.
- Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 16-20mm.

- Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 11-15mm.
- Peu ou non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est ≤ 10 mm.

5. Analyse statistique

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* ont été soumis à une analyse de la variance à un facteur (ANOVA1), avec un niveau de signification de 0,05 en utilisant le logiciel IBM SPSS Statistics 24.0. Chaque essai est répété trois fois. L'analyse statistique a été faite dans le but de d'évaluer l'effet de l'huile essentielle sur les microorganismes ATCC testés, faire une comparaison par rapport aux diamètres des zones d'inhibition prises comme variables.

Nous avons utilisé le test Newman-Keuls ($S < 0,05$) dans ce contexte.

RÉSULTATS

1. Rendement et composition chimique de l'huile essentielle

Le rendement moyen en huile essentielle est de 0,98% \pm 0,01. Cette valeur est légèrement inférieure à celle rapportée par Kabouche *et al.* qui est de 2% [12]. La composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* de Noé d'Aflou, le pourcentage et modes d'identification des composés sont mentionnés dans le tableau 1 [13].

Tableau 1: Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* de Noé.

N°	Composés	Indices de Rétention	% du composé	Identification
1	3-Heptanone	886	t	IR-SM
2	Tricyclene	923	t	IR-SM
3	α -Thujene	927	0,3	IR-SM
4	α -Pinene	936	0,1	IR-SM-ET
5	Camphene	950	0,1	IR-SM-ET
6	1-Octen-3-ol	980	t	IR-SM
7	3-Octanone	985	0,1	IR-SM
8	β -Pinene	978	0,7	IR-SM-ET
9	β -Myrcene	989	0,4	IR-SM-ET
10	α -Phellandrene	1004	0,1	IR-SM-ET
11	δ -3-Carene	1011	t	IR-SM-ET
12	α -Terpinene	1017	0,1	IR-SM-ET
13	p-Cymene	1024	15,5	IR-SM-ET
14	Limonene	1030	0,2	IR-SM-ET
15	β -Phellandrene	1030	0,1	IR-SM
16	cis- β -Ocimene	1038	t	IR-SM
17	trans- β Ocimene	1048	t	IR-SM
18	γ -Terpinene	1060	18,7	IR-SM-ET
19	Cis Sabinene hydrate	1067	0,2	IR-SM
20	1-Nonen-3-ol	1085	t	IR-SM
21	3-Nonanone	1087	t	IR-SM
22	Terpinolene	1087	t	IR-SM-ET
23	p-Cymenene	1088	t	IR-SM
24	trans Sabinene hydrate	1098	t	IR-SM
25	Linalool	1099	4,0	IR-SM-ET
26	Camphor	1143	t	IR-SM-ET
27	Borneol	1166	1,3	IR-SM-ET
28	α -Terpineol	1190	0,4	IR-SM-ET
29	Thymol methyl ether	1234	15,2	IR-SM
30	Carvacrol methyl ether	1243	0,1	IR-SM
31	Nerol	1229	t	IR-SM
32	Thymol	1290	35,8	IR-SM-ET
33	Carvacrol	1300	2,2	IR-SM-ET
34	Nonyl acetate	1309	0,1	IR-SM

35	Thymol acetate	1356	t	IR-SM
36	Eugenol	1358	t	IR-SM-ET
37	α -Copaene	1376	t	IR-SM
38	β -Bourbonene	1384	t	IR-SM
39	β -Elemene	1390	t	IR-SM
40	β -Caryophyllene	1420	1,5	IR-SM
41	trans- α -Bergamotene	1435	t	IR-SM
42	Aromadendrene	1441	t	IR-SM
43	cis- β -Farnesene	1446	t	IR-SM
44	α -Humulene	1453	t	IR-SM
45	Alloaromadendrene	1460	t	IR-SM
46	Germacrene D	1481	t	IR-SM
47	Ledene	1486	t	IR-SM
48	Bicyclogermacrene	1494	0,2	IR-SM
49	β -Bisabolene	1508	t	IR-SM
50	γ -Cadinene	1513	0,1	IR-SM
51	δ -Cadinene	1523	0,10	IR-SM
52	Cadina-1,4-diene	1531	t	IR-SM
53	α -Muurolene	1498	t	IR-SM
54	cis- α -Bisabolene	1540	t	IR-SM
55	Spathulenol	1576	0,3	IR-SM
56	Caryophyllene oxide	1581	0,2	IR-SM
57	Viridiflorol	1691	t	IR-SM
58	t-Cadinol	1635	0,1	IR-SM
59	β -Eudesmol	1650	t	IR-SM
60	α -Cadinol	1652	t	IR-SM
			98,2	
	Composés identifiées (%)			
.	Hydrocarbures monoterpéniques		36,3	
.	Monoterpènes oxygénés		59,3	
.	Hydrocarbures sesquiterpéniques		1,9	
.	Sesquiterpènes oxygénés		0,6	
.	Autres		0,1	

Composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne HP5MS; t: trace (< 0,05%). Identification :

IR= Comparaison de l'indice de rétention calculé par rapport à ceux de la littérature ;

SM= comparaison du spectre de masse à ceux des spectres des bibliothèques informatisées (Wiley 7N) du logiciel d'identification ainsi que ceux de la littérature ;

Et : comparaison des indices de rétention par rapport à ceux de composés purs (étalons) disponibles dans le laboratoire d'analyse. Les indices de rétention sont calculés par rapport à une série d'alcane C₇-C₁₇ injectés dans les mêmes conditions que l'huile étudiée.

L'analyse de l'huile essentielle par CG/SM nous a permis l'identification 60 composés qui représentent 98,2% de la composition totale de l'huile essentielle du thym. Les molécules les plus importants sont: le Thymol à 35,8%, le α -Terpinene à 18,7%, le p-Cymene à 15,5%, le Thymol méthyl ether à 15,2%, Linalool à 4% et Carvacrol à 2,2%. Le composé majoritaire de l'huile essentielle est un monoterpène oxygéné, *Thymus guyonii* de Noé d'Aflou étudié est à chémotype thymol.

2. Activité antimicrobienne

Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et comparés avec celle de l'échelle de Mutai et al. [11]. Nous avons vu que l'huile essentielle de *Thymus guyonii* a fortement inhibé la croissance de toutes les bactéries et levures testées (Tableau 2). Nous avons remarqué que la zone d'inhibition la plus élevée est celle de *Candida albicans* qui est de (64,00 \pm 2,00 mm), ce qui est très important pour la thérapie contre les infections contre ce microorganisme pathogène pour l'homme. La plus faible valeur est celle de (22,00 \pm 0,00 mm), qui n'est pas négligeable pour un microorganisme très résistant à tout agent antimicrobien et antibiotique [14].

Tableau 2: Sensibilité des souches étudiées à l'huile essentielle de *Thymus guyonii* (diffusion en mm par disque \pm Standard déviation).

Souches	ATCC	Gram	Huile essentielle de <i>Thymus guyonii</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	46,00 \pm 0,00
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	46,00 \pm 2,00
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	32,33 \pm 2,08
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	34,66 \pm 1,53
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	45,00 \pm 1,00
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	-	26,33 \pm 1,53
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	31,00 \pm 0,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	46,00 \pm 2,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	22,00 \pm 0,00
<i>Candida albicans</i>	24433	/	64,00 \pm 2,00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	/	35,00 \pm 2,08

Les valeurs des CMI mesurés concordent avec les zones d'inhibitions réalisées car la CMI est inversement proportionnelle au diamètre des zones d'inhibition (Tableau 3). La valeur la plus élevée de CMB/CMF a été observée chez

Pseudomonas aeruginosa et qui est de 0,5% (v/v). Par contre les valeurs les plus faibles, qui sont à 0,06% (v/v) sont notées chez *Candida albicans* et *Bacillus cereus*.

Tableau 3: Les valeurs de CMI et CMB/CMF de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* des souches microbiennes testées

Souches	Huile essentielle de <i>Thymus guyonii</i>			
	ATCC	Gram	CMI(%)	CMB(%)
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	0,06	0,125
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	0,06	0,06
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	0,125	0,125
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	0,125	0,125
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	0,06	0,125
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	-	0,25	0,25
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	0,125	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	0,06	0,125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	0,25	0,5
<i>Candida albicans</i>	24433	/	0,03	0,06
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	/	0,125	0,125

Les résultats des CMI et CMB ou CMF varient d'un microorganisme à un autre, dans certains cas elles sont égales comme nos résultats (Tableau 4). Ce qui indique une forte action bactéricide et ou fongicide. Car, lorsque le rapport CMB/CMI et ou CMF/CMI \geq 4, l'huile essentielle est dite bactériostatique et ou fongistatique [15]. Mais, lorsque le rapport CMB/CMI et ou CMF/CMI $<$ 4, on dit que l'huile essentielle est bactéricide et ou fongicide. Le tableau 4 indique que l'huile essentielle de *Thymus guyonii* a un effet bactéricide et fongicide sur toutes les bactéries et levures testées.

Les résultats de l'analyse statistique des diamètres des zones d'inhibition comme variables, ont mis en évidence une différence significative entre les souches microbiennes testées (test Newman-Keuls et ANOVA1, $S < 0,05$). Ce test nous a permis de classer les souches selon leur sensibilité comme suit:

Candida albicans $>$ *Klebsiella pneumoniae*; *Bacillus cereus*; *Bacillus subtilis* $>$ *Staphylococcus aureus* $>$ *Saccharomyces cerevisiae* $>$ *Micrococcus luteus* $>$ *Enterococcus faecium* $>$ *Escherichia coli* $>$ *Bordetella bronchiseptica* $>$ *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 4: Les rapports des CMB/CMI, CMF/CMI de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* calculés vis à vis des souches ATCC

Souches	ATCC	Gram	CMB/CMI ou CMF/CMI	Interprétation
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	2,08	Bactéricide
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	1,00	Bactéricide
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	1,00	Bactéricide
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	1,00	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	2,08	Bactéricide
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	-	1,00	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	1,00	Bactéricide
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	2,08	Bactéricide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	2,00	Bactéricide
<i>Candida albicans</i>	24433	/	2,00	Fongicide
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	/	1,00	Fongicide

DISCUSSION

Le rendement de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* de Noé obtenu (0,98% ± 0,01) est similaire à celui rapporté par Hazzit *et al.* qui est de 1% [16] et légèrement inférieur à celui cité par Zeghib *et al.* (1,5%) [17] et Kabouche Z *et al.* (2%) [11,18]. En effet le rendement peut être influencé par plusieurs paramètres intrinsèques (étapes de croissance et l'âge du matériel végétal) et extrinsèques de la plante comme la période et milieu de récolte, les pratiques culturales, ainsi toutes conditions pédo-climatiques, le séchage et les méthodes d'extraction) [19]. Les facteurs abiotiques ou caractéristiques physico-chimiques ont un effet sur le rendement en huile essentielle, l'humidité, la température, le temps de l'insolation et les vents qui influencent directement sur les espèces qui ont des structures histologiques de stockage superficielle comme le thym [20 ; 21 ; 22 ; 23]. Le chémotype de l'huile essentielle analysée est le Thymol qui est un Monoterpène Oxygéné Phénolique avec une teneur de 35,8%, ce qui met l'espèce étudiée dans le groupe des Thyms à Thymol. Le composant cité est suivi γ -Terpinène à 18,7%, le p -Cymène à 15,5%, le Thymol methyl ether à 15,2%, Linalool à 4% et Carvacrol à 2,2%. Le chémotype de *Thymus guyonii* rapporté par Zeghib *et al.* de M'sila [19] est Carvacrol à 55,55% suivi de Thymol à 21,18%, p -Cymène à 9,7% et γ -Terpinène à 5,7%. Le Carvacrol comme produit majoritaire est aussi observé par Kabouche *et al.* au niveau de *Thymus guyonii* de Zelfana (Ghardaia) [11], avec une valeur de 55,55% suivi du Thymol à 19,5% et p -Cymène à 6,25%.

Par contre le chémotype cité par Hazzit M *et al.* est le p -cymène à raison de 18,6% identifié dans *Thymus guyonii* de Djelfa, suivi de γ -Terpinène à 13,0%, Thymol à 10,9%, Thymol methyl ether à 10,7% et Carvacrol à 4,2%. En littérature l'huile essentielle de Thym est caractérisée par sa richesse en monoterpènes phénoliques, la majorité des travaux réalisés mentionnent que le chémotype des Thyms étudiés est soit Thymol ou Carvacrol [11 ; 13]. Suivi de leurs précurseurs biogénétiques qui sont p -Cymène et γ -Terpinène formant la majeure partie des huiles essentielles de Thym avec une teneur de plus de 70% [20 ; 24].

Le Thymol composant majoritaire de *Thymus de guyonii* étudié d'Aflou est retrouvé en deuxième place au niveau de *Thymus guyonii* de M'sila de même que celui de Ghardaia avec des valeurs rapprochées. Mais en troisième position au niveau de *Thymus guyonii* de Djelfa. Par contre le Carvacrol qui est composé majoritaire de *Thymus guyonii* de M'sila et Ghardaia est retrouvé avec de faibles valeurs chez *Thymus guyonii* d'Aflou et de Djelfa.

Les changements aperçus dans la composition chimique des huiles essentielles, d'une manière qualitative et quantitative, peuvent être dues à l'âge de la plante, à la période du cycle végétatif, à la partie de la plante utilisée et à certains facteurs écologiques, ou même à des facteurs génétiques [25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29].

Les résultats de l'activité antimicrobienne révèlent que l'huile essentielle de *Thymus guyonii* a inhibé la croissance de toutes les bactéries et levures testées. Parmi les bactéries Gram+, ce sont *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* qui ont montré une zone d'inhibition de croissance la plus élevée (46,00±0,00mm) et (46,00±2,00mm),

la croissance de *Staphylococcus aureus* a été fortement inhibée par l'huile essentielle avec (45,00±1,00mm). Ce résultat paraît intéressant surtout que cette bactérie est pathogène pour l'homme et qu'elle est à l'origine de dangereuses intoxications alimentaires. Notons que la valeur citée est plus élevée que celle rapportée par Kabouche *et al.* [12] chez *Thymus guyonii* de Ghardaia (30,0±1,5mm), qui a été citée comme la plus haute zone d'inhibition des souches étudiées.

Suivi de *Micrococcus luteus* et *Enterococcus faecium* avec des halos d'inhibition respectivement (34,66±1,53mm) et (32,33±2,08mm).

Parmi les bactéries Gram-, l'huile essentielle de *Thymus guyonii* a inhibé fortement la croissance de *Klebsiella pneumoniae* (qui est aussi une bactérie pathogène pour l'homme lui causant de nombreuses infections graves) avec une zone d'inhibition de (46,00±2,00mm), suivi de *Escherichia coli* (31,00±0,00mm), ensuite *Bordetella bronchiseptica* (26,33±1,53mm), puis *Pseudomonas aeruginosa* (22,00±0,00mm), qui s'est avérée la plus résistante des microorganismes étudiés, cette valeur est à prendre en considération, car cette bactérie a été citée par plusieurs auteurs, comme étant très résistante à tout agent antimicrobien et antibiotique [14]. De même qu'elle a été citée par Kabouche *et al.* [12] comme étant la plus résistante des bactéries testées avec une zone d'inhibition de (20,5±1,1mm).

Concernant les levures, c'est *Candida albicans* qui a révélé la plus puissante sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* d'Aflou avec un diamètre d'inhibition de (64,00±2,00mm) supérieur à *Saccharomyces cerevisiae* (35,00±2,08mm) et à toutes les bactéries étudiées, ce qui est intéressant du fait que cette levure cause de nombreuses infections chez l'homme.

L'huile essentielle de *Thymus guyonii* a exercé une action inhibitrice importante vis-à-vis des microorganismes testés. Toutes les souches sont inhibées à des concentrations allant de 0,03 à 0,25%(v/v). La valeur CMI la plus élevée est celle de *Pseudomonas aeruginosa* et la plus faible est celle de *Candida albicans*, ce qui correspond aux zones d'inhibition car les CMI sont inversement proportionnelles aux halos d'inhibition [30].

Toutes les valeurs de CMB/CMF sont inférieures à 4, donc l'huile essentielle a révélé à la fois une excellente activité bactéricide et fongicide sur toutes les bactéries et levures testées.

Ces résultats nous confirment que l'huile essentielle testée est un puissant antimicrobien, par sa forte teneur en thymol (35,8%), qui est un composé monoterpène phénolique connu pour avoir une grande action antiseptique et antimicrobienne. A forte concentration, il est responsable d'une action bactéricide rapide car il traverse la paroi bactérienne et dénaturent les protéines. Et à faible dose il est bactériostatique [14]. D'autres travaux ont suggéré aussi que ce composé volatil est responsable de l'inactivation d'enzymes, y compris ceux impliqués dans la production d'énergie et la synthèse des constituants de structure des bactéries et levures [31 ; 32]

CONCLUSION

L'huile essentielle extraite de *Thymus guyonii* de Noé d'Aflou (Sahara Algérien septentrional) est composée de molécules majoritaires qui sont Thymol, γ Terpinene, p-Cymene, Thymol methyl ether, Linalool et Carvacrol. La plante est à chémotype Thymol (35,8%). Les résultats de l'activité antimicrobienne indiquent que l'huile essentielle de *Thymus guyonii* possède un large spectre d'action vis à vis de toutes les bactéries et levures testées. Ainsi qu'elle est bactéricide et fongicide par sa riche composition en produits phénoliques. Ce qui favorise son utilisation dans les produits pharmaceutiques comme l'antibiotique naturel du futur.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Stahl-Biskup E. and Sàez F. (2002). Thyme. *The genus Thymus*. Ed Taylor & Francis, 330p.
- [2]. Quezel P. et Santa S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques*. Tome II, Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 600p.
- [3]. Barnes J., Anderson L. and Phillipson J.D. (2007). *Herbal Medicine*. Edition Pharmaceutical press Ph P, third edition, 710p.
- [4]. Bremness L. (2005). *Plantes aromatiques et médicinales*. Edition Larousse, Paris, 304p.

- [5]. **Aissaoui A. (2016).** Hydrologie et hydrogéologie du bassin versant de l'oued M'Zi. (Laghouat, Algérie) Thèse de Magister Sciences de la Terre option Hydrogéologie, Université d'Oran2 Mohamed Ben Ahmed, Faculté des Sciences de la Terre et de l'Univers, Oran, 142p.
- [6]. **Anonyme. (2008).** *Pharmacopée Européenne*, 6ème édition.
- [7]. **Hazzit M. (2008).** Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de Thym et d'Origan poussant en Algérie. Thèse de Doctorat en Chimie, Université des Sciences et de Technologie Houari Boumedienne, Alger, 204p.
- [8]. **Chikhoun A. (2007).** Huiles essentielles de Thym et d'Origan. Thèse de Magister en Agronomie option Sciences Alimentaires, Institut National Agronomique El Harrach, Alger, 178p.
- [9]. **Courvalin P., Leclercq R. et Bongen E. (2012).** *Antibiogramme*. Edition ESKA, 3^{ème} édition, Paris, 800p.
- [10]. **Mebarki N. (2010).** Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanessi* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Thèse de Magistère en Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques option Industrie Pharmaceutique, Université M'hamed Bougara, Faculté des Hydrocarbures et de la Chimie, Boumerdes, 185p.
- [11]. **Mutai C., Bii C., Vagias C., Abatis D. et Roussis V. (2009).** Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 143-148.
- [12]. **Lehibili M., Chibani S., Kabouche A., Semra Z., Smati F., Abuhamdah S., Touzani R. and Kabouche Z. (2013).** Composition, antibacterial and antioxidant activity of essential oil of *Thymus guyonii* de Noé from Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, 5 (2): 306-310.
- [13]. **Babushok V. I., Linstrom P. J., and Zenkevich I. G. (2011).** Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 40 (4): 043101-47
- [14]. **Pibiri, M.C. (2006).** *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles*. Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse, 177p.
- [15]. **Oussou K.R. (2008).** Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 24 (1) : 94-103.
- [16]. **Hazzit M., Baaliouamer A., Leonor M., Faleiro M. et Graa. M. (2006).** Composition of essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17): 6314-6321.
- [17]. **Zeghib A., Kabouche A., Laggoune S., Calliste C.-A., Simon A., Bressolier P., Aouni M., Duroux J.-L. and Kabouche Z. (2017).** Antibacterial, Antiviral, Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Thymus guyonii* Essential Oil. *Natural Product Communications*, 12 (10) : 1651 - 1654.
- [18]. **Ghorab H., Kabouche A. and Kabouche Z. (2014).** Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa. *J. Mater. Environ. Sci.* 5, (1), 298-303.
- [19]. **Hamrouni, Sellami I., Maamouri E., Chahed T., Aidi W., Kchouk M.E. and Marzouk, B. (2009).** Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana L.*). *Industrial Crop and Products*, 30: 395-402.
- [20]. **Boulaghmen F. (2012).** Extraction des huiles essentielles de l'origan. Thèse de Magistère en Biotechnologie végétales option Biologie, Université Saad Dahlab de Blida, Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques, Blida, 143p.
- [21]. **Lalami E.O., El-Akhal A., Ouedrhiri F., Ouazzani Chahdi W., Guemmouh F., Greche Hassane R. (2013).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain: *Thymus vulgaris* et *Thymus satureioidis*. *Les Technologies De Laboratoire* Vol. 8, N°31.
- [22]. **Aberchane M., Fechtal M., Chaouch A. et Bouayoune T. (2001).** Influence de la durée et de la technique d'extraction sur le rendement et la qualité des huiles essentielles du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* Manetti). *Annales de la recherche forestière au Maroc*, 34 : 110-118.
- [23]. **Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine, M., Chaouch A., Satrani, B. (2009).** Effet du séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) *Masters Agrosolution*, 20 (1) : 44-48.

- [24]. Hüsni K., Baser C. and Buchbauer G. (2010). *Handbook of essential oils : Science, Technology and Applications*, editors Taylor & Francis, USA, 975p.
- [25]. Senatore F. (1996). Influence of harvesting time on yield and composition of essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (5): 1327-1332.
- [26]. Kokkini S., Karousou R., Dardioti A., Krigas N. and Lanaras T. (1997). Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry*, 44 (5): 883-886.
- [27]. Russo M., Galletti G.C., Bocchini P. and Carnacini A. (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Fluorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (9): 3741-3746.
- [28]. Thompson J.D., Chalchat J.C., Michet A., Linhart Y.B. and Ehlerset B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemistry and Ecology*, 29 (4): 859-880.
- [29]. Karousou R., Karousou R., Koureas D.N. and Kokkini S. (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete, *Photochemistry*, 66 (22): 2668-2673.
- [30]. Bekhechi C., Atik-Bekkara F et Abdelouahid D.E. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, 6 : 153-159.
- [31]. EL Ajjouri M., Satrani B., Ghanmi M., Aafi A., Farah A., Rahouti M., Amarti F. et Aberchane M. (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 12(4) : 345-351.
- [32]. Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M. et Chaouch A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algériensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 14(1) : 141-148.

Participation aux séminaires et congrès

Communications affichées intitulées:

- « Etude physico-chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* d'Aflou Algérie » au niveau des **1^{ères} journées nationales sur le stress oxydant et les maladies du siècle** tenues à l'université de Blida 1- Algérie, du 12 au 13 Juin 2019.
 - « Etude de la composition chimique et de l'activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Origanum floribundum* Munby de Hamam Melouane Algérie » **Congrès international sur la valorisation et la préservation de la biomasse (CI-VAPB 2017)**, tenu à l'université de Boumerdes- Algérie, du 05 au 06 Novembre 2017.
- « Etude physico-chimique et activité cicatrisante de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* d'Aflou Algérie » au niveau du **1st international congress on biotechnologies for sustainable development in Boumerdes Algéria (CIBSDD 2017)**, tenu à l'université de Boumerdes- Algérie, du 24 au 25 Octobre 2017.

Communication orale intitulée:

- « Etude de l'activité antimicrobienne d'huile essentielle extraite d'*Origanum floribundum* Munby de Hamam Melouane Algérie » au niveau du **1^{er} séminaire national de « Phytothérapie & santé »**, tenu à l'université de Blida 1- Algérie, du 16 au 18 Mai 2017.

APPENDICES

APPENDICE A

➤ **Liste des abréviations, symboles et conventions :**

ADN	Adenosine désoxy-ribo-nucléique
AFNOR	Association Française de Normalisation
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine Triphosphate
BHA	Butyl Hydroxy Anisol
BHT	Butyl hydroxy Toluène
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication des médicaments
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMF	Concentration Minimale Fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CO ₂	Dioxyde de Carbone
CPG/SM (ou CG/SM)	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée au Spectromètre de Masse
CT	Coupe transversale
CRAPC	Centre de Recherche scientifique et technique en Analyses Physico-Chimiques
CRD	Centre de Recherche et Développement
DPPH	2-2 Diphépyl-1-Picryl Hydrazyl
EOR	Espèces Oxygènes Réactives

GRAS	Generally Recognized As Safe
HCl	Acide chlorhydrique
HE	Huiles Essentielles
HECT	Huiles Essentielles Chémotypées
HD	Hydrodistillation
IA	Indice d'Acide
IBM	International Business Machines
IE	Indice d'Ester
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
IPC	Indice d'irritation Primaire Cutanée
IR	Indice de Rétention
KOH	Hydroxyde de Potassium
LPS	Lipopolysaccharides
MH	Mueller Hinton
NaCl	Chlorure de Sodium
NaOH	Hydroxyde de Sodium
Na ₂ SO ₄	Sulfate de Sodium Anhydre
NIST	National Institute of Standard Technology
OF	<i>Origanum floribundum</i>
OG	<i>Origanum glandulosum</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity

PA	Principe actif
PAM	Plantes Aromatiques et Médicinales
Ph. Eur	Pharmacopée Européenne
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
SAB	Gélose Sabouraud
SOD	Superoxyde Dismutase
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TSA	Gélose Trypticase de Soja
USC	unité formant une colonie
VRBG	Gélose Glucosée Biliée au cristal violet et au rouge neutre
W	Wilaya

APPENDICE B

➤ Composition des milieux de culture utilisés:

- MUELLER-HINTON gélosé (MH) : (g/l)

Infusion de viande de bœuf02, 0 g

Hydrolysate acide de caséine.....17, 5 g

Amidon.....01, 5 g

pH : 7,4

Autoclaver pendant 15 min à 115°C.

- SABOURAUD gélosé simple (SAB) : (g/l)

Néopeptone10 g

Glucose.....20 g

Agar.....20 g

pH : 5 - 5,6

Autoclaver pendant 15 min à 115°C.

- TRYPTONE-SOJA-AGAR (TSA) : (g/l)

Tryptone.....15 g

Peptone de Soja.....5 g

Chlorure de Sodium.....5 g

Agar.....15 g

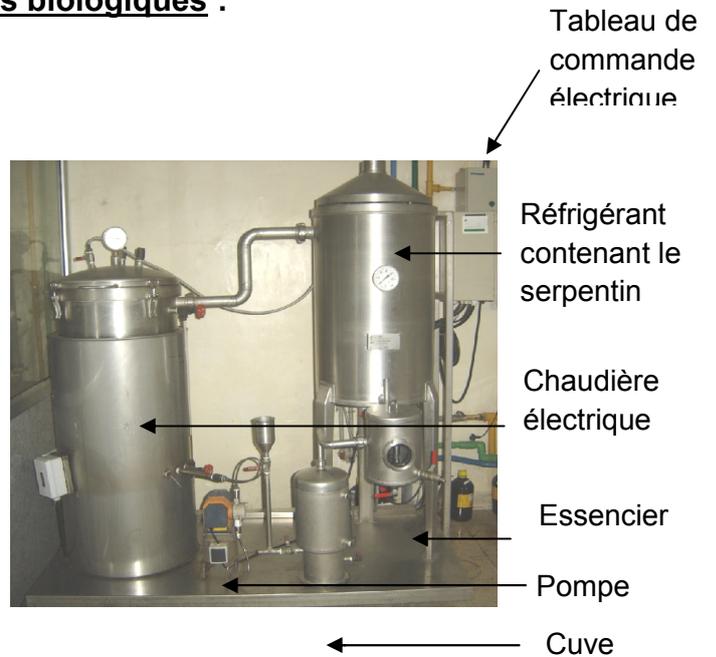
Autoclaver pendant 15 min à 121°C.

APPENDICE C

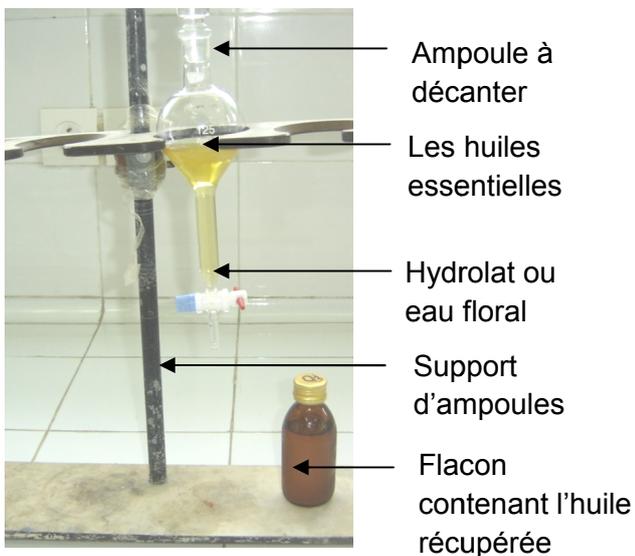
➤ Appareillage utilisé et tests biologiques :



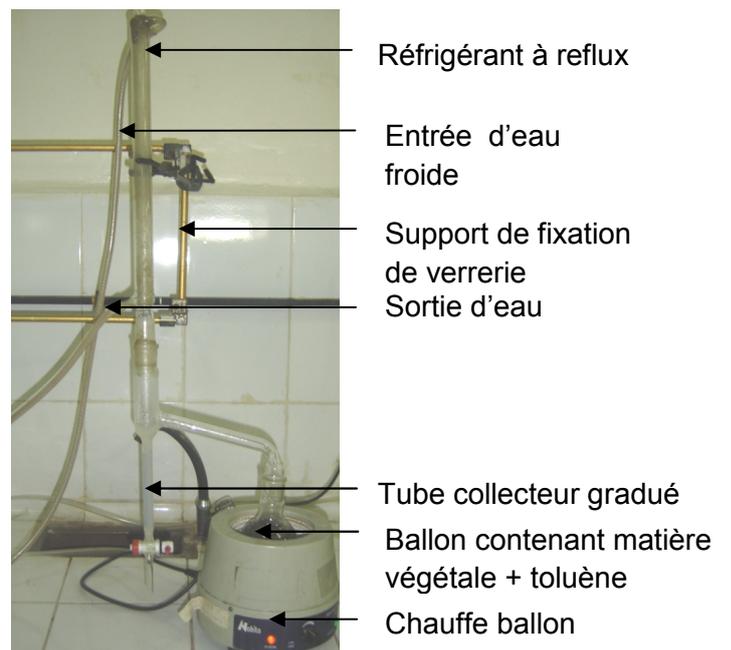
C1 : Confection de blocs de paraffine et coupes au microtome.



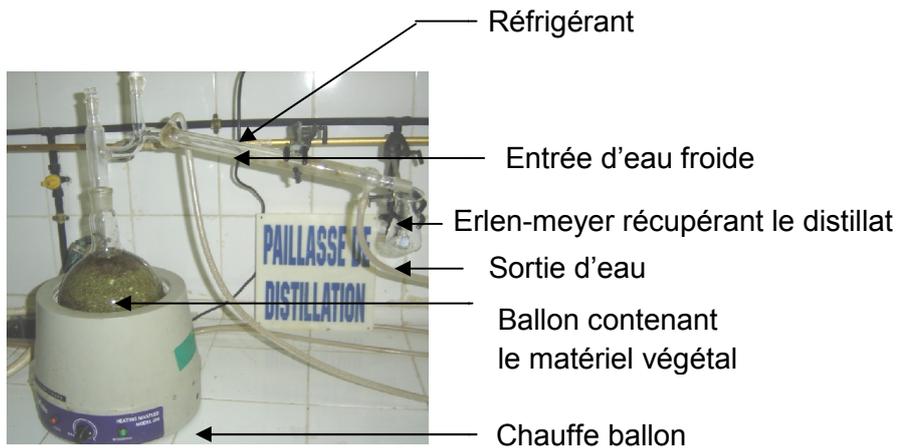
C2 : Alambic semi industriel.



C3 : Séparation d'HE par décantation.



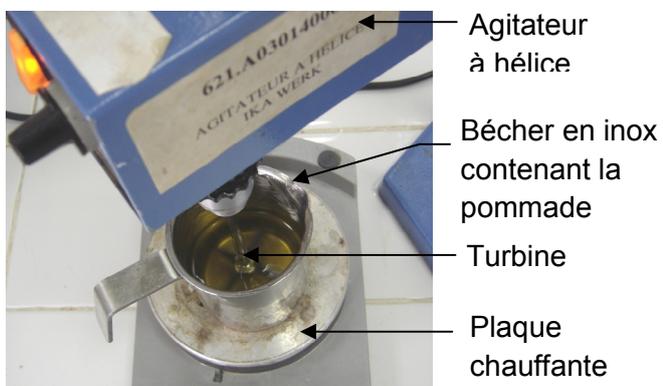
C4 : Appareil Dean et Starck



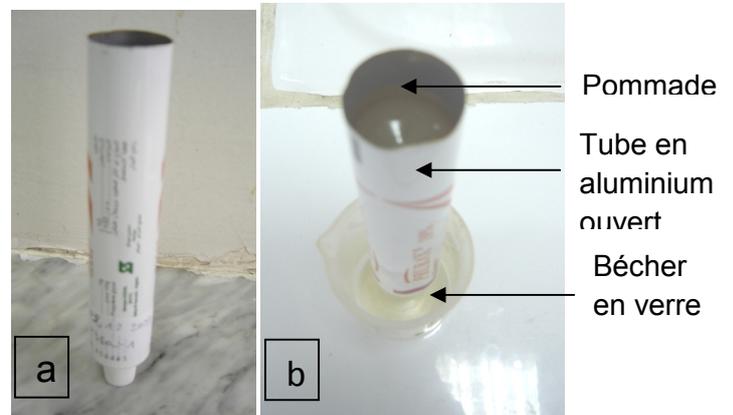
C5 : Hydrodistillation à l'échelle de laboratoire.



C6 : Appareil CG/SM



C7 : Préparation de la pommade



C8 : Conditionnement de la pommade a et b.



C9 : Injection intramusculaire de Ketamine et Acepromazine



C10 : Mobilisation du rat

APPENDICE D

➤ Protocoles utilisés

1. Technique histologique (coupe au microtome)

La technique nécessite 3 étapes fondamentales :

1.1 Fixation des organes

Pour la fixation de nos organes (feuilles, tiges et pétioles), nous avons utilisé le mélange formol alcool, acide acétique (FAA) composé de :

- ✓ 8 volumes d'éthanol 70°.
- ✓ 1 volume de formol.
- ✓ 1 volume d'acide acétique glacial.

Un passage sous vide dans le dessiccateur pendant une heure est nécessaire, pour permettre une meilleure pénétration du fixateur dans les tissus tout en éliminant l'eau des cellules et éviter ainsi une désorganisation des structures.

Le temps de fixation est de 24 heures à 48 heures selon la taille et la consistance des organes fixés.

Après fixation, les organes sont trempés dans l'éthanol 70° qui assure une bonne conservation des organes pendant plusieurs mois.

1.2. Inclusion des organes dans la paraffine

Cette étape nécessite de faire une déshydratation progressive des pièces à l'éthanol dans un premier temps, puis une imprégnation par le toluène, avant l'inclusion des organes dans la paraffine fondue.

1.2.1. Déshydratation

C'est le traitement par l'éthanol de concentration progressivement croissante qui représente le mode de déshydratation traditionnelle, utilisée pour amorcer l'extraction de l'eau ou autres produits.

Cette étape consiste à éliminer toute l'eau ou le fixateur qui se trouve dans les tissus destinés à être inclus dans la paraffine.

La déshydratation consiste à mettre les organes dans des bains d'éthanol à raison d'une heure comme suit :

- Ethanol 95° pendant 1 heure.
- Ethanol 95° pendant 1 heure.
- Ethanol 100° pendant 1 heure.
- Ethanol 100° pendant 1 heure.
- Ethanol 100° pendant 1 heure ou 1 nuit.

Pour les organes à consistance dure, le passage dans des bains de butanol est nécessaire après passage dans de l'alcool 70° et 90° comme suit :

- Ethanol 70° pendant 1 heure.
- Ethanol 95° pendant 1 heure.
- Ethanol 95° pendant 30 minutes.
- Butanol pendant 24 heures.
- Butanol pendant 24 heures.

Après les 3 bains de butanol, le passage à l'éthanol absolu est nécessaire :

- Ethanol 100° pendant 1 heure.
- Ethanol 100° pendant 1 heure.
- Ethanol 100° pendant 1 heure.

1.2.2. Imprégnation

Cette étape permet d'éliminer toute trace d'éthanol, et cela pour une meilleure pénétration de la paraffine dans les tissus.

L'imprégnation par le toluène (hydrocarbure benzénique) est recommandée pour la rapidité de sa pénétration ; celle-ci se traduit par un éclaircissement des pièces.

L'imprégnation se déroule en plongeant les fragments d'organes dans :

- Toluène + alcool (1V/1V) pendant 30 minutes.
- Toluène pur pendant 1 heure.

- Toluène pur pendant 1 heure.
- Toluène pur pendant 1 heure.
- Toluène + paraffine fondue (1V/1V), pendant 30 minutes à $58 - 60 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Paraffine pendant 1 heure à $58 - 60 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Paraffine pendant 1 heure à $58 - 60 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Paraffine pendant 1 nuit ou plus à $58 - 60 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

1.2.3. Inclusion à la paraffine

L'inclusion se fait à la paraffine pure qui est coulée à chaud $65 \pm 4^{\circ}\text{C}$ (température de fusion de la paraffine) dans un modèle de moule :

Le modèle cassette

Ce système consiste à remplir les moules métalliques de paraffine neuve fondue, dans laquelle on dépose délicatement l'échantillon puis on place les cassettes (en plastique) identifiées sur les moules de manière à ce que cette paraffine pénètre dans les perforations des cassettes, le durcissement se fait une plaque réfrigérante pendant 10 minutes.

Nous obtenons à la fin des blocs et des cassettes ou les fragments sont parfaitement inclus, le passage à l'étape suivante nécessite une heure d'attente au minimum.

1.3. Confection des coupes et coloration

Les organes inclus dans la paraffine sont débités en coupes sériées à l'aide d'un microtome manuel (type leica) à une épaisseur de $7\mu\text{m}$.

Les rubans de coupes réalisées sont placés sur des lames propres mises préalablement dans de l'éthanol 95° puis séchées à l'aide d'un papier hygiénique, numérotées avec un diamant puis étalées par une eau gélatineuse préparée par 0,1 g de gélatine en poudre dans 100 ml d'eau distillée.

Les lames sont mises ensuite sur une plaque chauffante réglée à $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ afin d'étaler les coupes en évitant leur plissement.

1.3.1. Déparaffinage

Le déparaffinage est une étape qui précède la coloration. Il consiste à éliminer la paraffine des tissus pour faciliter la pénétration des colorants.

Cette étape est assurée par trois bains de toluène :

- Un bain de toluène pur pendant 15 minutes sur plaque chauffante.
- Un bain de toluène pur pendant 10 minutes sur plaque chauffante.
- Un bain de toluène pur pendant 10 minutes sur plaque chauffante.

1.3.2. Réhydratation

La réhydratation a pour but de préparer les coupes à l'action du colorant miscible à l'eau, elle consiste à faire passer les coupes dans :

- Trois bains d'alcool absolu pendant 10 minutes chacun.
- Un bain d'alcool pur/formol (4v/1v) pendant 5 minutes.

Les coupes sont ensuite rincées à l'eau courante (GABE, 1968) [83].

1.3.3. Coloration

Nous avons utilisé la double coloration Carmino-vert, cette méthode permet de différencier les tissus. Les tissus lignifiés ou subérifiés apparaissent en vert et les tissus à parois cellulosiques en rouge [82].

1.3.3.1. Double coloration carmino-vert

La technique a pour protocole suivant :

- Placer les coupes 10 à 20 minutes dans l'hypochlorite de sodium (eau de javel 12°) pour la destruction des structures cytoplasmiques.
- Laver abondamment à l'eau.
- Laver dans l'acide acétique dilué à 1% pendant 15 minutes (mordançage qui a pour but d'augmenter l'affinité des colorants).
- Laver à l'eau courante pendant 5 à 10 minutes.

- Colorer 5 minutes dans le carmin aluné.
- Laver à l'eau courante pendant 5 à 10 minutes.
- Colorer 30 secondes au vert d'iode.
- Après lavage à l'eau courante, les coupes sont montées entre lame et lamelle puis observées au microscope photonique.

2. Technique histologique (coupe à main levée)

Les coupes transversales à main levée sont effectuées sur les feuilles fraîches et tige. Les organes sont disposés entre deux tranches de moelle de sureau pris entre le pouce et l'index, afin d'obtenir des coupes très fines pour pouvoir les observer au microscope photonique.

2.1. Double coloration vert de méthyl- rouge congo

- les coupes sont plongées dans l'eau de Javel à 12° pendant 10 à 15 min pour vider les cellules,
- Après rinçage à l'eau courante 5 à 10 min, les coupes sont traitées par l'acide acétique (10%) pendant 1 à 2 min pour faciliter la diffusion des colorants,
- Elles sont ensuite lavées à l'eau courante 5 à 10 min et placées dans le vert de méthyle pendant 15 à 20 min,
- Les coupes sont rincées à l'eau courante 5 à 10 min puis plongées dans le rouge Congo 15 à 20 min,
- Après lavage à l'eau courante, elles sont montées entre lame et lamelle puis observées au microscope photonique.

APPENDICE E

➤ Entretien des animaux de laboratoire testés

Les animaux utilisés lors des tests pharmaco-toxicologiques proviennent de l'animalerie du CRD de SAIDAL d' El Harrach

Caractéristiques des animaux utilisés :

- Lapins Albinos, de souche néo-zélandaise.
Nombre = 06, sexe : mâle, poids : 2,5-3Kg.
- Rats Albinos de race Whistar
Nombre = 20, sexe : mâle et femelle, poids : 200g.

Habitat :

- Température : 22-25°C.
- Humidité : 50-60%
- Eclairage : artificiel (12/24heures)

Nourriture :

Elle est sous forme de granulés originaires de l'ONAB (Office Nationale d'Alimentation du Bétail) dont la composition est la suivante :

Composés	%
Humidité	14 max
Matière minérale	8 min
Matière protéique	22 min
Matière grasse	2,5 min
Cellulose	3 max
Vitamine A	12300 ul/Kg
Vitamine B	20mg/Kg
Fer	76mg/Kg
Magnésium	25 g/Kg

Abreuvement :

Il se fait par l'eau de robinet (fraîche remplie dans des bouteilles en plastiques de 500ml.

Contention :

Elle doit être ferme pour éviter toute morsure et maîtriser ainsi les réactions, parfois vives de l'animal. Le rat est pris par la base de sa queue et mise sur le grillage de la cage, puis saisie au niveau de la peau du dos près des oreilles. Donc dans ce cas, l'animal ne sera plus capable de tourner la tête pour mordre.

Marquage :

Il est essentiel pour l'identification des animaux. Il se fait par un marqueur coloré sur la queue pour le rat et sur les oreilles pour le lapin.



E1 : Lapin Albinos (souche Néozélandaise).



E2 : Rat Albinos (Whistar),

APPENDICE F

➤ Tableaux illustrant quelques résultats

Appendice F.1 : Pouvoir de piégeage du radical DPPH (% ± écart type) par les HE (de *Thymus guyonii*, *d'Origanum floribundum*, BHT et tocophérol) en fonction des concentrations (mg/l) des échantillons

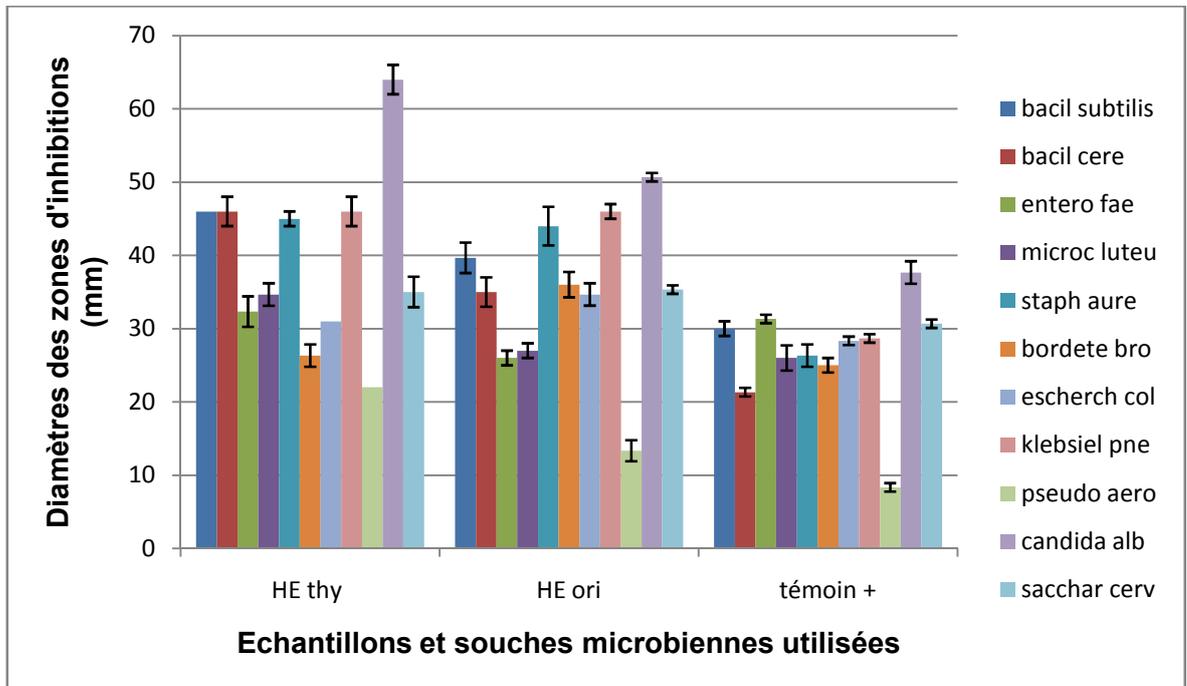
Echantillons/ Concentrations	10	20	50	100	200	400	600	800	1000
HE de thym	/	/	/	03,0±1,2	17,4±0,3	26,5±1,05	32,9±2,0	41,6±1,8	51,8±0,4
HE d'origan	/	/	/	18,27±0,9	23,68±0,2	39,97±1,38	71,16±0,49	80,79±0,83	79,6±0,43
BHT	31,4±0,7	42,14±0,48	62,49±0,69	73,2±0,9	80,6±0,3	84,8±0,5	86,4±0,6	88,8±0,3	91,1±0,1
Tocophérol	/	/	/	73,5±0,8	74,0±0,8	76,0±1,1	76,2±1,0	78,4±0,2	80,2±1,1

Appendice F.2 : Test du pouvoir réducteur du BHT, acide ascorbique, l'HE *d'Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii*.

Concentration en mg/l	^a Absorbance à 700nm				
	HE d'origan	HE de thym	Tocophérol	BHT	Acide ascorbique
100	0,57 ± 0,026	0,98 ± 0,06	0,87 ± 0,013	1,43 ± 0,02	1,34 ± 0,043
200	0,86 ± 0,055	1,39 ± 0,03	1,55 ± 0,037	1,66 ± 0,056	1,43 ± 0,013
400	1,26 ± 0,053	1,50 ± 0,03	1,79 ± 0,043	1,75 ± 0,056	1,49 ± 0,019
600	1,39 ± 0,01	1,59 ± 0,03	1,94 ± 0,047	1,81 ± 0,025	1,55 ± 0,054
800	1,40 ± 0,006	1,72 ± 0,03	1,98 ± 0,003	1,80 ± 0,027	1,61 ± 0,027
1000	1,47 ± 0,017	1,75 ± 0,02	2,03 ± 0,01	1,98 ± 0,014	1,71 ± 0,011

^a Les résultats sont moyennes ± écart type de trois mesures.

Appendice F3 : Activité antimicrobienne (étude qualitative) d'HE de *Thymus guyonii* et d'*Origanum floribundum* sur les différentes souches microbiennes.



**Appendice F.4 : Evaluation de la surface et profondeur de cicatrisation chez le rat,
pour chaque produit appliqué, en fonction du temps (jours).**

produit testé		Aucun trait	Excipient	HE ORI 0,5%	HE ORI 1%	HE THY 0,5%	HE THY 1%	MADECA 1%
jour 0	surface	19,62 ± 0,00	19,62 ± 0,00	19,62 ± 0,00	19,62 ± 0,00	19,62 ± 0,00	19,62 ± 0,00	19,62 ± 0,00
	profondeur	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
jour 2	surface	17,76 ± 2,64	16,09 ± 4,99	14,64 ± 3,14	13,38 ± 3,71	14,64 ± 3,14	11,58 ± 1,70	16,64 ± 1,67
	profondeur	4,00 ± 0,00	3,5 ± 0,71	3,4 ± 0,42	3,3 ± 0,44	3,33 ± 0,45	3,17 ± 0,00	3,6 ± 0,55
jour 6	surface	11,84 ± 4,35	10,45 ± 2,65	10,36 ± 3,01	9,18 ± 2,28	11,38 ± 1,61	10,73 ± 3,17	13,30 ± 2,65
	profondeur	3,25 ± 0,5	3,00 ± 0,5	2,8 ± 0,27	2,8 ± 0,45	3,00 ± 0,71	2,67 ± 0,58	2,6 ± 0,55
jour 8	surface	6,72 ± 3,26	5,54 ± 1,90	3,925 ± 1,43	3,49 ± 0,79	8,75 ± 2,90	4,58 ± 2,67	10,36 ± 3,28
	profondeur	3,00 ± 0,00	2,25 ± 0,29	1,9 ± 0,22	1,2 ± 0,45	2,1 ± 0,22	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
jour 12	surface	4,45 ± 2,27	2,22 ± 0,79	1,65 ± 0,97	0,78 ± 0,00	1,65 ± 0,97	1,76 ± 0,00	3,22 ± 1,11
	profondeur	2,33 ± 0,58	1,5 ± 0,5	0,9 ± 0,22	0,8 ± 0,27	1,6 ± 0,22	0,83 ± 0,29	1,7 ± 0,27
jour 14	surface	3,27 ± 1,57	1,90 ± 1,18	1,45 ± 1,03	0,43 ± 0,32	0,94 ± 0,79	1,44 ± 0,57	1,37 ± 0,54
	profondeur	2,00 ± 0,00	1,00 ± 0,5	0,5 ± 0,00	0,5 ± 0,00	0,5 ± 0,00	0,6 ± 0,29	0,7 ± 0,27

Appendice F5: Taux de contraction des surfaces des plaies traitées par les pommades à l'HE, Madécasol, excipient et placebo.

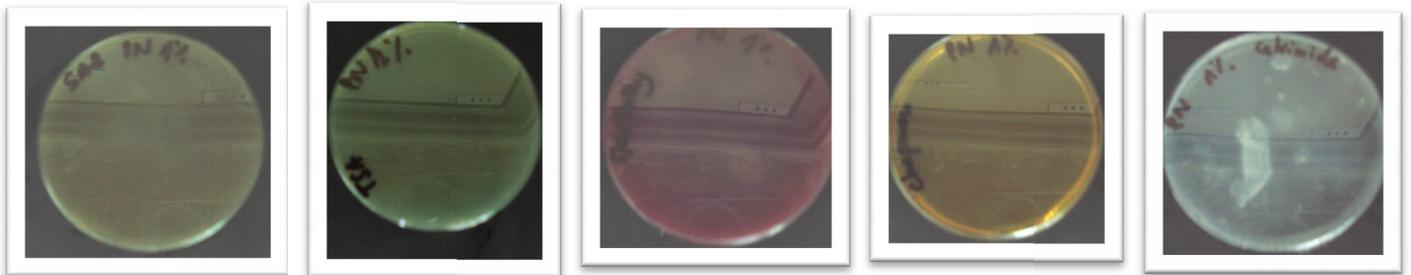
produit testé	Aucun trait	Excipient	HE ORI 0,5%	HE ORI 1%	HE THY 0,5%	HE THY 1%	MADECA 1%
% de réduction j2	9,50%	18%	25,40%	31,80%	25,4%	41%	15,20%
% de réduction j6	39,67%	46,75%	47,20%	53,20%	55,41%	45,33%	32,20%
% de réduction j8	65,76%	71,77%	80%	82,22%	91,59%	88,13%	47,20%
% de réduction j12	77,33%	88,67%	91,60%	96%	94,60%	92,36%	83,60%

% de réduction j14	83,34%	90,33%	92,60%	97,80%	95,06%	92,66%	93%
--------------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-----

APPENDICE G

➤ Résultats du contrôle microbiologique des pommades dermatiques

Appendice G₁ : Recherche de bactéries et levures par le test de pureté de la pommade dermatique à base d'HE d'*Origanum floribundum*



a : Recherche des levures

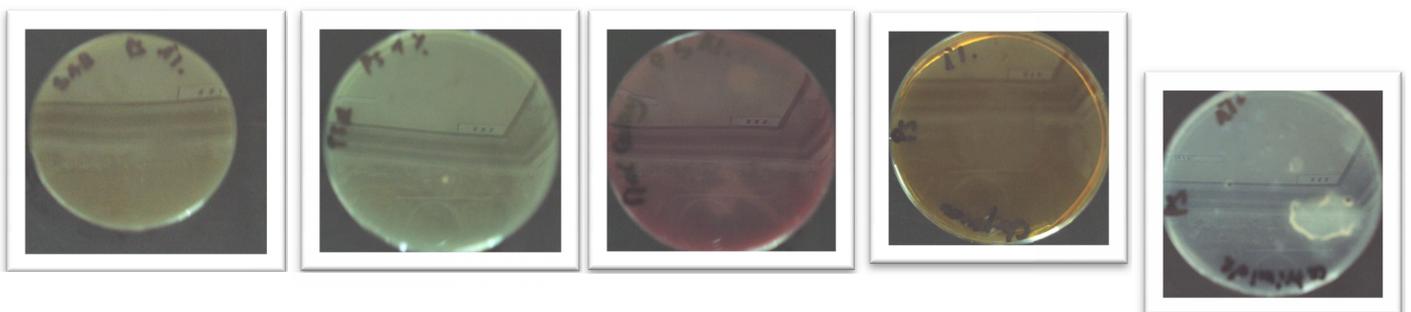
b : Recherche des mésophiles

c : Recherche des *Escherichia coli*

d : Recherche des staphylocoques

e : Recherche des pseudomonases

Appendice G₂ : Recherche de bactéries et levures par le test de pureté de la pommade dermatique à base d'HE de *Thymus guyonii*



a' : Recherche des levures

b' : Recherche des mésophiles

c' : Recherche des *Escherichia coli*

d' : Recherche des staphylocoques

e' : Recherche des pseudomonases

APPENDICE H

➤ Etude statistique

1. Activité antimicrobienne d'HE d'*Origanum floribundum* et de *Thymus guyonii* :

1.1 influence des souches microbiennes sur les zones d'inhibition (ANOVA 2):

- L'essai :
 - Variable Y: zone d'inhibition (activité antimicrobienne);
 - Facteur A : HE et témoin positif avec 03 possibilités (origan, thym, témoin positif) ;
 - Facteur B : Souches avec 11 possibilités (Souches microbiennes) ;
- Hypothèses testées :
 - H_0^A : Absence d'action du facteur A (pas de différence significative en terme diamètre de la zone d'inhibition entre les deux huiles et témoin positif) ;
 - H_0^B : Absence d'action du facteur B (pas de différence significative en terme diamètre de la zone d'inhibition entre les 11 souches) ;
 - $H_0^{A \times B}$: Absence d'interaction entre A et B.
- Règles de décision :
 - On accepte H_0^A , H_0^B et $H_0^{A \times B}$, si les valeurs de signification sont supérieures à 0,05, dans le cas contraire, les hypothèses H_0^A , H_0^B et $H_0^{A \times B}$ sont rejetées.

❖ Analyse de la variance :

Tests des effets inter-sujets

Variable dépendante: Activité antimicrobienne (diamètre des zones d'inhibition)

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
HE	2602,263	2	1301,131	670,023	,000
Souches	7273,172	10	727,317	374,535	,000
HE * Souches	1815,071	20	90,754	46,734	,000
Erreur	128,167	66	1,942		
Total corrigé	11818,672	98			

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, et en se référant aux règles de décision, on rejette les hypothèses : H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} .

Donc au seuil de 5% :

- **Le facteur A** agit : L'HE a un effet significatif sur le diamètre de la zone d'inhibition (activité antimicrobienne).

- **Le facteur B** agit : la souche microbienne a un effet significatif sur la zone d'inhibition.

- **Le facteur AxB** agit : L'interaction entre les deux variables qualitatives « HE » et « souches microbiennes » a un effet significatif sur le diamètre de la zone d'inhibition.

❖ Test de Newman-Keuls :

Lorsque l'hypothèse H_0 est rejetée, on effectue ce test pour classer les moyennes pour chaque facteur (HE et souches microbiennes).

a - Facteur « HE »

Student-Newman-Keuls^{a,b}

HE	Sous-ensemble		
	1	2	3
Témoin positif	26,6970		
HE organ		35,2424	
HE thym			38,9394

Les résultats du test de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des HE, selon leurs activités antimicrobiennes :

HE thym > HE organ > témoin positif

b - Facteur « souches microbiennes »

Student-Newman-Keuls^{a,b}

Souches	Sous-ensemble						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14,5556						
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		29,1111					
<i>Micrococcus luteus</i>		29,2222					
<i>Enterococcus faecium</i>		29,8889					
<i>Escherichia coli</i>			31,3333				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				33,6667			
<i>Bacillus cereus</i>				34,1111			
<i>Staphylococcus aureus</i>					38,4444		
<i>Bacillus subtilis</i>					38,5556		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>						40,2222	
<i>Candida albicans</i>							50,7778

Les résultats du test Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des souches microbiennes selon leur sensibilité:

Candida albicans > *Klebsiella* > *Bacillus subtilis* ; *Staphylococcus* > *Bacillus cereus* ; *Saccharomyces* > *E coli* > *Enterococcus* ; *Micrococcus* ; *Bordetella* > *Pseudomonas* .

2. Activité antioxydante d'HE d'origan et de thym :

2.1. Influence de la nature de l'antioxydant sur l'activité antioxydante :

2.1.1. Activité du piégeage du radical DPPH :

- L'essai :
 - Variable Y: Activité de piégeage du radical DPPH ;
 - Facteur A : Nature de l'antioxydant avec 04 possibilités (HE origan, HE thym, BHT et tocophérol) ;

- Facteur B : Concentrations avec 06 possibilités (100, 200, 400, 600, 800, 1000mg/l) ;
- H_0^A : Absence d'action du facteur A (pas de différence en terme d'activité de piégeage du DPPH entre les quatre antioxydants) ;
- H_0^B : Absence d'action du facteur B (pas de différence en terme d'activité de piégeage du DPPH entre les 06 concentrations) ;
- H_0^{AxB} : Absence d'interaction entre A et B.
- Règles de décision :
- On accepte H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} , si les valeurs de signification sont supérieures à 0,05, dans le cas contraire, les hypothèses H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} sont rejetées.

❖ Analyse de la variance :

Tests des effets inter-sujets

Variable dépendante: Activité de piégeage du DPPH

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Antioxydant	34023,308	3	11341,103	13500,268	,000
Concentration	10708,832	5	2141,766	2549,525	,000
Antioxydant * Concentration	6533,116	15	435,541	518,461	,000
Erreur	40,323	48	,840		
Total corrigé	51305,579	71			

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, et en se référant aux règles de décision, on rejette les hypothèses : H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} .

Donc au seuil de 5%

- Le facteur A agit : la nature de l'antioxydant a un effet significatif sur l'activité de piégeage du radical DPPH ;

- Le facteur B agit : la concentration a un effet significatif sur le pouvoir de piégeage du radical DPPH ;
- Le facteur A x B agit : l'interaction entre les deux variables qualitatives : « nature de l'antioxydant » et « concentration » : a un effet significatif sur l'activité de piégeage du radical DPPH

❖ Test de Newman-Kules :

Lorsque l'hypothèse H_0 est rejetée, on effectue ce test pour classer les moyennes pour chaque facteur.

a) Facteur « Nature de l'antioxydant » :

Activité de piégeage du DPPH

Student-Newman-Keuls^{a,b}

Antioxydant	Sous-ensemble			
	1	2	3	4
HE thym	28,6794			
HE organ		52,2482		
Tocophérol			76,3683	
BHT				84,1183

Les résultats du test de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des antioxydants, selon leurs activités de piégeage du DPPH :
BHT > tocophérol > HE organ > HE thym.

b) Facteur « Concentration » :

Activité de piégeage du DPPH

Student-Newman-Keuls^{a,b}

Concentration	Sous-ensemble					
	1	2	3	4	5	6
100 mg/l	41,9856					
200 mg/l		48,9108				
400 mg/l			56,7708			
600 mg/l				66,6550		
800 mg/l					72,3908	
1000 mg/l						75,4083

Les résultats du test de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des concentrations, selon leurs activités de piégeage du DPPH / 1000
> 800 > 600 > 400 > 200 > 100mg/l

2.1.2. Pouvoir réducteur :

- L'essai :
 - Variable Y: Pouvoir réducteur :
 - Facteur A : Nature de l'antioxydant avec 05 possibilités (HE origan, HE thym, BHT, Tocophérol et Vitamine C) ;
 - Facteur B : Concentration avec 06 possibilités (100, 200, 400, 600, 800 et 1000 mg/l) ;
- Hypothèses testées :
 - H_0^A : Absence d'action du facteur A (pas de différence en terme de pouvoir réducteur entre les quatre antioxydants) ;
 - H_0^B : Absence d'action du facteur B (pas de différence en terme de pouvoir réducteur entre les 06 concentrations) ;
 - H_0^{AxB} : Absence d'interaction entre A et B.

- Règle de décision :
 - On accepte H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} , si les valeurs de signification sont supérieures à 0,05 dans le cas contraire, les hypothèses H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} sont rejetées.

❖ Analyse de la variance

Tests des effets inter-sujets

Variable dépendante: Pouvoir réducteur (absorbance)

	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Antioxydant	3,743	4	,936	786,380	,000
Concentration	5,670	5	1,134	952,976	,000
Antioxydant * Concentration	1,169	20	,058	49,109	,000
Erreur	,071	60	,001		
Total	218,255	90			
Total corrigé	10,654	89			

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, et en se référant aux règles de décision, on rejette les hypothèses : H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} .

Donc au seuil de 5% :

- Le facteur A agit : la nature de l'antioxydant a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.
- Le facteur B agit : la concentration a un effet significatif sur le pouvoir réducteur ;
- Le facteur A x B agit : L'interaction entre les deux variables qualitatives « nature de l'antioxydant » et « concentration » a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

❖ Test de Newman-Keuls :

Lorsque l'hypothèse H_0 est rejetée, on effectue ce test pour classer les moyennes pour chaque facteur.

a- Facteur « nature de l'antioxydant » :

Pouvoir réducteur (absorbance)

Student-Newman-Keuls^{a,b}

Antioxydant	Sous-ensemble				
	1	2	3	4	5
HE origan	1,1594				
HE thym		1,4839			
Vit C			1,5211		
Tocophérol				1,6944	
BHT					1,7350

Les résultats de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des antioxydants, selon leurs pouvoirs réducteurs :

BHT > tocophérol > vitamine C (acide ascorbique) > HE thym > HE origan.

b- Facteur «Concentration»:

Pouvoir réducteur (absorbance)

Student-Newman-Keuls^{a,b}

Concentration	Sous-ensemble					
	1	2	3	4	5	6
100 mg/l	1,0373					
200 mg/l		1,3767				
400 mg/l			1,5527			
600 mg/l				1,6560		
800 mg/l					1,7020	
1000 mg/l						1,7880

Les résultats de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des concentrations selon leur pouvoir réducteur :

1000 > 800 ; 600 > 400 > 200 > 100mg/l.

3. Activité cicatrisante de l'HE d'origan et du thym :

3.1 Influence de l'agent cicatrisant sur % de contraction de plaie (% de réduction de plaie) :

- à L'essai :

- Variable Y : % de contraction de plaie ;

- Facteur A : Agent cicatrisant avec 07 possibilités (Placebo, excipient, Madecazol ® 1%, pommade à base d'HE d'origan (0,5% et 1%) et pommade à base d'HE de thym (0,5% et 1%).

- Facteur B : Temps de cicatrisation avec 06 possibilités (0, 2, 6, 8, 12 et 14 jours) ;

- Hypothèses testées :

- H_0^A : Absence d'action du facteur A (pas de différence en terme de réduction de plaie entre les 07 agents cicatrisants ;

- H_0^B : Absence d'action du facteur B (pas de différence en terme de réduction de plaie entre les 06 jours proposés ;

- H_0^{AxB} : Absence d'interaction entre A et B.

- Règles de décision :

On accepte H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} , si les valeurs de signification sont supérieures à 0,05, dans le cas contraire, les hypothèses H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} sont rejetées.

Tests des effets inter-sujets

Variable dépendante: Contraction

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Cicatrisants	3404,478	6	567,413	4,205	,001
Temps	141791,623	5	28358,325	210,180	,000
Cicatrisants * Temps	3538,571	30	117,952	,874	,653
Erreur	11333,641	84	134,924		
Total corrigé	160068,314	125			

Analyse de la variance :

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, et en se référant aux règles de décision, on rejette les hypothèses : H_0^A , H_0^B et $H_0^{A \times B}$.

Donc au seuil de 5% :

- Le facteur A agit : l'agent cicatrisant a un effet significatif du point de vue statistique sur la contraction de plaie ;
- Le facteur B agit : le temps a un effet significatif sur la contraction de plaie ;
- Le facteur A x B agit : L'interaction entre les deux variables qualitatives : « agent cicatrisant » et « temps » : n'a pas d'effet significatif sur la contraction de plaie.

❖ Test de Newman-Keuls :

Lorsque l'hypothèse H est rejetée, on effectue ce test pour classer les moyennes pour chaque facteur.

a- Facteur « agent cicatrisant »

Contraction

Student-Newman-Keuls^{a,b}

Cicatrisants	Sous-ensemble		
	1	2	3
Témoin	44,7611		
Excipient	46,5000	46,5000	
Pom HE thym 0,5%	51,1533	51,1533	51,1533
Madecazol 1%	53,3767	53,3767	53,3767
Pom HE origan 0,5%		55,7150	55,7150
Pom HE thym 1%			57,7667
Pom HE origan 1%			59,7756

Les résultats de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des agents cicatrisants selon leur pouvoir de contraction de plaie :

Pommade HE origan 1%; pommade HE thym 1% > pommade HE 0,5%;
pommade HE thym 0,5%; Madécazol ® 1%excipient >; témoin (placebo);.

b- Facteur « temps » :

Contraction

Student-Newman-Keuls^{a,b}

Temps	Sous-ensemble				
	1	2	3	4	5
0 jour	,0000				
2 jour		23,9781			
6,jour			43,8524		
8 jour				67,7452	
12 jour					88,6167
14 jour					92,1348

Les résultats de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement du temps selon la contraction de plaie (cicatrisation).

14 jours (j) ; 12 j > 8 j > 6 j > 2 j > 0 j.

APPENDICE I

➤ Glossaire

Actinique: Se dit d'un éclairage qui provoque une réaction chimique

Adventive: racine apparait directement sur la tige, de façon accidentelle, fortuit et inhabituelle

Akène : Fruit sec monosperme (formé d'une seule graine), indéhiscent (demeure clos).

Alambic : appareil permettant la distillation

Antibactérien : qui détruit les bactéries

Antifongique : qui détruit les champignons

Anti-inflammatoire : qui élimine l'inflammation

Antioxydant : produit qui empêche l'oxydation

Antiparasitaire : qui détruit les parasites

Antirhumatisme : qui guérit le rhumatisme

Antiseptique : qui détruit tous les germes

Antispasmodique : qui empêche l'action des spasmes

Antitoxique : qui élimine les toxines

Antivenimeuse : qui neutralise l'action des venins

Antiviral : qui détruit les virus

Aseptisation aérienne : stérilisation de l'air

Bactéricide : qui tue les bactéries

Bactériostatique : qui inhibe la multiplication et croissance des bactéries

Biofilm : formation d'un film pelliculaire de résistance chez certaines bactéries

Bractée : est une pièce florale en forme de feuille faisant partie de l'inflorescence

Catarrhe: inflammation des muqueuses s'accompagnant d'une hypersécrétion des glandes de la région enflammée.

Chromatographie préparative : la chromatographie préparative est considérée, dans une large mesure, comme un processus de purification utilisant la chromatographie en phase liquide.

Décanté : la décantation est une opération de séparation mécanique, sous l'action de la gravitation, de plusieurs phases non-miscibles et de densités différentes.

Décombante : qui, s'élevant d'abord, retombe ensuite vers la terre comme Tige décombante.

Diurétique : qui augmente la sécrétion de l'urine.

DL50 : dose létale à 50 %, Cet indicateur mesure la dose de substance causant la mort de 50 % d'une population animale donnée (souvent des souris ou des rats) dans des conditions d'expérimentation précises.

Emarginée : qualifie une feuille très légèrement échancrée au sommet.

Essence : substance volatile et aromatique extraite des plantes par distillation

Exserte : qualifie un organe qui dépasse largement, qui fait saillie hors de la structure dans laquelle il est inséré.

Flétan : stimulant cellulaire

Fleurs disjointes : fleurs détachées

Fongicide : qui tue les champignons

Fongistatique : qui inhibe la croissance des champignons

Génotoxique : se dit d'une substance ou d'un rayonnement qui peut compromettre l'intégrité du génome.

Halo d'inhibition : zone entourant le disque d'aromatogramme marquant l'inhibition de croissance des microorganismes étudiés.

Hermaphrodite : se dit d'un être vivant portant les organes reproducteurs des deux sexes, mâle et femelle

Histamine : est une molécule de signalisation du système immunitaire, c'est un médiateur chimique synthétisé

Hydrolat : appelé aussi eau de distillation ou eau florale, obtenu par distillation de la plante aromatique et séparé d'huile essentielle surnageant

Létale : qui peut provoquer la mort

Microbiocide : qui tue les microorganismes

Miscible : désigne usuellement la capacité de divers liquides à se mélanger.

Ovaire supère : les pièces florales sont insérées en dessous de l'ovaire dans ce cas la fleur est hypogyne. Dans le cas contraire l'Ovaire infère: les pièces florales sont insérées au-dessus de l'ovaire, la fleur est alors épigyne.

Papille : désigne une petite excroissance charnue, la plupart du temps formée par un tissu épithélial

Pauciflores: Qualifie une plante qui a peu de fleurs ou d'inflorescences

Plante annuelle : est une plante herbacée qui vit moins d'un an, et qui accomplit donc son cycle de vie en une seule année

Plante bisannuelle : est une plante qui accomplit son cycle de vie en deux années

Prostrée : étant couchée sur le sol

Rameuse : qui est partagé en branches

Sédatif : qui a une action dépressive sur le système nerveux central et qui entraîne un apaisement, une relaxation, une réduction de l'anxiété et une somnolence

Sessile : en botanique, lorsqu' une feuille, une fleur ou un fruit sont directement attachés à la tige, sans pétiole ou pédoncule

Sous-ligneuse : se dit d'une plante dont la tige n'est ligneuse qu'à la base

Stimulus : désigne tout ce qui est de nature à déterminer une excitation chez un organisme vivant

Suint : matière animale grasse qui sort du corps des moutons et qui s'attache à leur laine.

Synergie : un phénomène par lequel plusieurs facteurs agissant ensemble créent un effet plus grand que la somme des effets attendus s'ils avaient opéré indépendamment, ou créent un effet que chacun d'entre eux n'aurait pas pu obtenir en agissant isolément.

Toxicité aiguë : est la toxicité induite par l'administration d'une dose unique et massive de toxique, décrite comme la dose qui risque à 50% de tuer un être vivant. Elle est parfois notée LD₅₀, de l'anglais Lethal Dose 50%

Toxicité chronique : désigne un effet nocif (chronique) résultant de doses répétées d'une substance, ou d'expositions à celle-ci, au cours d'une période relativement longue. S'emploie ordinairement pour décrire les effets observés chez des animaux d'expérience.

Toxinogénèse : production de toxines

Usage topique : utilisation locale

Vivace : ou plante pérenne, est une plante vivant plus de deux ans, mais qui vit souvent beaucoup plus longtemps, la limite de deux ans étant fixée pour séparer les vivaces des bisannuelles

Volatil : qui s'évapore facilement