

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université SAAD Dahleb de Blida  
Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques  
Département de Biologie

Mémoire d'Etudes en vue de l'obtention du diplôme  
De Master en Science de la nature et de la vie

Option : Microbiologie - Bactériologie

**THEME**

**Etude des Activités Antibactérienne et  
Antifongique de l'Huile Essentielle  
du Thym (*Thymus vulgaris*)**

Présenté par : TACHEFINE Aziza

Soutenu le 23/09/2013 (9H00 C10)

Devant le jury composé de:

|                 |     |                               |              |
|-----------------|-----|-------------------------------|--------------|
| Mme AMARA N     | MAA | Département de Biologie, USDB | Présidente   |
| Mme DIF S       | MAA | Département de Biologie, USDB | Examinatrice |
| Mme AMEDJKOUH H | MAA | Département de Biologie, USDB | Examinatrice |
| M. FERHAT MA    | MCA | ENS Kouba, Alger              | Promoteur    |
| M. BOUKHATEM MN | MAA | Département de Biologie, USDB | Co-promoteur |

Promotion : 2012- 2013

## *Remerciement*

*Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.*

*Au terme de ce travail il nous est agréable de remercier toutes les personnes, qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement.*

*Tout d'abord, je remercie sincèrement Monsieur FARHAT Mohammed Amine Maître de conférence de l'ENS à Kouba qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour m'avoir accordé sa confiance et guidé dans mon travail tout au long de cette année, ses compétences, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse.*

*J'exprime mes respectueux Remerciements à Mon co promoteur Monsieur BOUKHATEM Mohammed Amine Maître assistant au département de Biologie à Blida pour son soutien, sa disponibilité, son intérêt pour ce travail et pour les nombreux conseils avisés qu'il a pu me donner au long de la thèse.*

*J'exprime mes respectueux remerciements aux jurys pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

## *Dédicace*

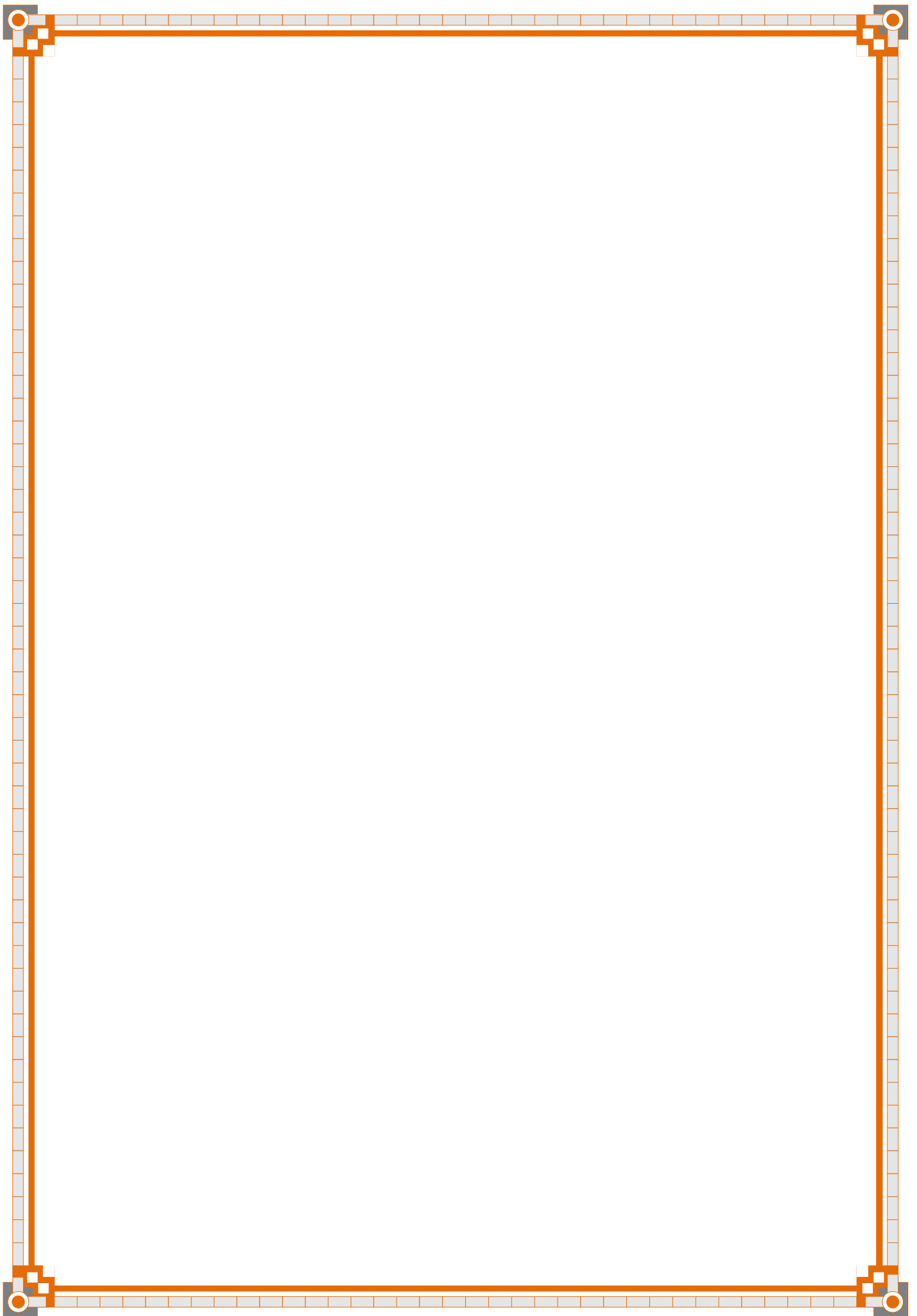
*A mes très chers parents, qui m'ont tant offert sans jamais se lasser, qui m'ont transmis le désir et m'ont toujours accompagné tout au long de mes études avec leur amour, leur soutien, leur compréhension et leurs encouragements, et m'ont permis de devenir ce que je suis, avec tout mon amour et ma reconnaissance.*

*A mes sœurs, Yamina, Khadidja, Meriem et Fahima, Ma belle sœur Wafia,*

*A mes frères Wahid, abdelkader, et lotfi, avec une profonde tendresse*

*A Mes neveux Abdalilah et Imed, mes sœurs Anfel, aya, rouia*

*A mon époux Mchammed, avec toute mon affection et mon amour.*



## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى إظهار قيمة التركيبة العطرية لنبته الزعتر (*Le thym*), كمادة زيتية أساسية ضد البكتيريا و الفطريات . بطريقتين : microatmosphère و aromato gramme

تمت عملية استخراج الزيت الأساسية للنبته إصطناعيا بواسطة طريقة التقطير البخاري. كذلك فقد كشفت مختلف التحاليل الفزيوكيميائية المنجزة للزيت الأساسية المدروسة أنها مطابقة للمعايير المعمول بها عالميا.

أما بالنسبة للتركيبة الكيميائية للزيت لأساسية لنبته الزعتر المنجزة عن طريق الكروماتوغرافيا (CG-SM)، فقد اثبتت ان الزيت العطري للزعتر غني بعدة مركبات كيميائية من أهمها :  
Le gamma terpène(4,96) , le para-cymène (8,15%) carvacrol (83,8%)  
Linalool (1,44% )

من جهة أخرى، فقد تم إختبار هذه الزيت العطرية ضد بعض العينات من الجراثيم البكتيرية و الفطرية بواسطة طرق مختلفة (aromatogramme, micro atmosphère). كشفت هذه التحاليل عن أن زيت نبته الزعتر فعال ضد معظم البكتيريا و الفطريات.

إن النتائج المتحصل عليها خلال هذه الدراسة تسمح بفتح آفاق لإستثمار هذه الزيوت العطرية الطبيعية في معالجة الأمراض المعدية الناجمة عن الجراثيم البكتيرية و الفطرية، وذلك كبديل للعلاج الكيميائي (الأدوية).

**الكلمات الرئيسية:** الزعتر ، الزيت الأساسية، العلاج بالزيوت الأساسية، ضد البكتيريا و الفطريات. , aromato gramme. microatmosphère.

## Résumé

L'objectif de notre travail consiste à déterminer l'activité antibactérienne et antifongique de l'Huile essentielle(HE) du thym (*Thymus vulgaris*) par deux méthodes différentes : aromagramme et microatmosphère.

L'extraction de l'HE du thym a été faite par l'hydrodistillation. La composition chimique de l'huile, déterminée par la chromatographie en phase gazeuse et chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, a révélé la présence de 13 composés. Le carvacrol (88%) semble être le composé majoritaire, suivi par le *p*-cymène (8,15%),  $\gamma$ -terpinène (4,96%) et linalool(1,44%).

Le screening antimicrobien d'HE en phase liquide a révélé qu'elle est très active contre les bactéries à Gram positive et les levures avec des diamètres des zones d'inhibition (DZI) qui varient entre 50 et 70 mm. Les Gram négatifs ont été faiblement inhibés alors que les moisissures sont, par contre, les plus résistantes.

En phase vapeur, l'essence a présenté une certaine activité bactériostatique sur les Gram positives avec des DZI qui varient entre 50 et 60 mm. C'est aussi un puissant fongicide car toutes les souches de levures ont été fortement inhibées (DZI > 51mm).

L'huile essentielle présente aussi une action « dose-dépendante » due probablement à la présence du monoterpène oxygénée (carvacrol), réputé pour son action antimicrobienne.

L'utilisation de l'huile essentielle nous paraît pleinement justifiée en aromathérapie anti-infectieuse.

**Mots-clés:** *Thymus vulgaris*; Huile essentielle; carvacrol ; aromagramme ; microatmosphère.

:

## Abstract

The aim of our study was to determine the chemical composition of essential oil (EO) of Thym (*Thymus vulgaris*) and to test its antimicrobial activity against a wide spectrum of microbial strains by two methods: disc diffusion and vapour diffusion methods.

The EO was extracted by hydrodistillation. The chemical composition, determined by gas chromatography, revealed that carvacrol was the major component (88%), followed by *p*-cymene,  $\gamma$ -terpene (4.96%), and linlool (1.44%).

By disc diffusion method, essential oil exhibited a good antimicrobial activity particularly against Gram positive bacteria and yeast with inhibition zones varied from 50 to 70 mm.

By vapor diffusion test, essential oil provides a potent antibacterial effect against Gram positive bacteria with inhibition zones ranged from 50 to 60 mm.

Else, our results revealed that essential oil possesses a strong anti-*Candida* property. Further, the inhibition zone increase with increasing in oil quantity. Carvacrol is responsible, probably, for this antimicrobial effect.

Use of oil essential of Thym could be suggested in aromatherapy to treat or prevent infectious diseases.

**Key words:** *Thymus vulgaris* ; Essential oil ; carvacrol ; disc diffusion method; vapour diffusion test.

# Sommaire

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....                                    | 1  |
| <b>PARTIE I : REVUES BIBLIOGRAPHIQUES</b>                             |    |
| <b>I- LES HUILES ESSENTIELLES</b> .....                               | 3  |
| 1.1- Historique.....  | 4  |
| 1.2- Définition générale d'une « Huile essentielle » .....            | 4  |
| 1.3- Localisation et rendement .....                                  | 5  |
| 1.4- Composition chimique.....  | 5  |
| 1.5- Profil chromatographique.....                                    | 8  |
| /1. 6- Notion de chémotype.....                                       | 9  |
| 1.7-Propriétés physiques .....  | 9  |
| 1.8-Voies d'administration .....                                      | 9  |
| 1.9-Toxicité.....   | 9  |
| 1.10-Domains d'utilisation des huiles essentielles.....               | 10 |
| 1.11-Procédés et équipement d'extraction des huiles essentielles..... | 12 |
| 1.12-Controle de qualité et normalisation .....                       | 13 |
| <b>II-<i>THYMUS VULGARIS</i></b> .....                                | 13 |
| 2.1- Historique.....  | 16 |
| 2.2- Classification.....  | 16 |
| 2.3-Variabilité et origine.....                                       | 19 |
| 2.4-Répartition géographique.....                                     | 19 |
| 2.5-Composition chimique de Thym.....                                 | 20 |
| 2.6-Utilisation.....  | 20 |
| <b>III-ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES HUILES ESSENTIELLES</b>           |    |
| 3.1-Historique.....   | 21 |
| 3.2-Activité antimicrobienne.....                                     | 21 |
| <b>PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTAL</b>                                |    |
| 4.1-Matériel végétal.....   | 25 |
| 4.2-Souches microbiennes.....   | 25 |
| 4.3- Protocole expérimental de l'hydrodistillation.....               | 25 |
| 4.4-Récupération et conservation des HE.....                          | 26 |
| 4.5-Rendement de l'extraction ... ..                                  | 28 |



|  |    |
|--|----|
| 6-Analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/SM)..... | 28 |
| 7-Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du thym.....  | 30 |

**PARTIE III : Résultats et discussions**

|  |    |
|--|----|
| 1-Extraction et rendement en HE.....                     | 35 |
| 2-Etude analytique de l'HE.....                          | 35 |
| 2-1:Cinétique d'extraction de l'HE.....                  | 36 |
| 3-Détermination du profil chromatographique de l'HE..... | 37 |
| 4-Résultats de l'activité antimicrobienne.....           | 39 |
| 5-Mécanisme d'action de l'HE.....                        | 47 |

|                         |    |
|-------------------------|----|
| <b>CONCLUSION</b> ..... | 51 |
|-------------------------|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>Références bibliographiques</b> ..... | 52 |
|--|----|

**Annexes**

## Liste des tableaux

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Tableau 1</b> | Classification botanique du thym.....  | 17 |
| <b>Tableau 2</b> | Souches bactériennes et fongiques utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne..... | 26 |
| <b>Tableau 3</b> | Transcription de diamètres d'inhibition des disques imprégnés d'HE.....                          | 33 |
| <b>Tableau 4</b> | Propriétés physiques et organoleptiques de l'HE du thym.....                                     | 35 |
| <b>Tableau 5</b> | Composition chimique de l'HE de <i>Thymus vulgaris</i> obtenue par HD.....                       | 39 |
| <b>Tableau 6</b> | Diamètres des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne.....                   | 40 |

## Liste des abréviations

---

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>AFNOR :</b>                    | Association Française de Normalisation                               |
| <b>GC/SM :</b>                    | Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse |
| <b>GC :</b>                       | Chromatographie en Phase Gazeuse                                     |
| <b><math>d_{20}^{20}</math> :</b> | Densité relative à 20°C  |
| <b>eV :</b>                       | Electron volte   |
| <b>FID :</b>                      | Détecteur à ionisation de flamme                                     |
| <b>Rdt :</b>                      | Rendement en huile essentielle                                       |
| <b>SM :</b>                       | Spectrométrie de Masse   |
| <b>V :</b>                        | Volume   |
| <b><math>\mu\text{L}</math> :</b> | Microlitre   |
| <b><math>\alpha</math> :</b>      | Alpha  |
| <b><math>\beta</math> :</b>       | Beta   |
| <b><math>\gamma</math> :</b>      | Gamma  |
| <b><math>\rho</math> :</b>        | Para   |
| <b>°C :</b>                       | Degré Celsius  |
| <b>HE</b>                         | Huile essentielle  |
| <b>HD</b>                         | Hydrodistillation  |



# Liste des figures

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Figure 1</b>  | Structures glandulaires chez les plantes aromatiques et médicinales.....           | 7  |
| <b>Figure2</b>   | Principaux composés des Huiles essentielles.....                                   | 8  |
| <b>Figure 3</b>  | quelques techniques d'extraction des HEs.....                                      | 15 |
| <b>Figure 4</b>  | <i>Thymus vulgaris</i> : aspects botanique.....                                    | 18 |
| <b>Figure 5</b>  | Répartition du thym dans le monde.....   | 19 |
| <b>Figure 6</b>  | Montage de l'appareil de clevenger 1928.....                                       | 27 |
| <b>Figure7</b>   | Illustration de la méthode de l'aromatogramme.....                                 | 32 |
| <b>Figure 8</b>  | Illustration de la méthode de la microatmosphère.....                              | 32 |
| <b>Figure 9</b>  | Cinétique d'extraction de l'HE d u thym par l'hydrodistillation.....               | 37 |
| <b>Figure 10</b> | Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> obtenue par HD.... | 38 |
| <b>Figure 11</b> | activité antibactérienne et antifongique de l'HE par<br>l'aromatogramme.....       | 44 |
| <b>Figure 12</b> | activité antibactérienne et antifongique de l'HE par la<br>microatmosphère.....    | 45 |

**Figure 15** : activité antibactérienne et antifongique de l'HE par la microatmosphère  
.....41

.

## Introduction

Avec la généralisation, à la fin des années 1940, de l'utilisation des antibiotiques (ATB), les médecins ont commencé à vaincre les maladies infectieuses qui ravageaient l'humanité depuis si longtemps. Mais, ensuite, à la fin des années 1980, les ATB ont commencé à ne plus être salués comme le miracle qu'ils avaient semblé être 40 ans plus tôt. Pourtant et dès 1945, le bactériologiste britannique Alexander Fleming a lancé un avertissement dans un article publié dans le New York Times. Il craignait qu'un mauvais usage de la Pénicilline ne conduise à sélectionner et à propager des formes mutantes de bactéries résistantes. Il avait raison, ses paroles étaient prémonitoires. De nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des ATB (**Breuil et al., 2001 ; Jans et al., 2011**).

Par ailleurs, la généralisation d'une utilisation excessive des ATB à large spectre semble également avoir favorisé un nouveau problème. Elle est souvent la cause d'une infection secondaire par des levures, en particulier par *Candida albicans*. Une autre conséquence inattendue de l'utilisation des ATB est l'apparition de salmonelloses. Les personnes sous ATB, au moment où elles consomment de la viande ou du lait contaminé, se trouvent prises de fortes diarrhées dues à une salmonelle résistante. Sous la pression sélective du médicament, la salmonelle s'est suffisamment développée pour déclencher une gastro-entérite et, dans certains cas, une infection sanguine susceptible d'entraîner la mort (**Monnet, 2000**).

Malgré tous les efforts déployés dans l'antibiothérapie, on est toujours surpris par l'apparition de souches résistantes à un ATB ou même à l'association de plusieurs en même temps, ce qui rend l'éradication de ce germe fatal est irréalisable (**Bolis, 2011**).

De nombreuses études traitent de l'activité antimicrobienne des HE, qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès d'aromathérapie scientifique. De nombreux travaux, essentiellement de laboratoire, sont venus renforcer ces résultats, expliquer les modes d'actions de certains de leurs composants (**De Billerbeck, 2007 ; Inouye et Abe, 2007**).

L'étude de ces essences est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels de domaines tels que la pharmacognosie et la microbiologie. Cela tient principalement au fait que le règne végétal est une source présumée inépuisable d'une immense variété de médicaments potentiels, tout en étant accessible, y compris dans les pays en voie de développement. De plus, cette science évolue et s'affine sans cesse avec l'amélioration des instruments d'investigation et de l'accès à l'information scientifique. Cette dernière perspective permet d'élargir le champ de valorisation des plantes aromatiques et médicinales (PAM), (autrefois

restreint du point de vue économique, à l'extraction de molécules olfactives), par l'exploitation des nombreuses et diverses activités biologiques, substantiellement évoquées par la médecine traditionnelle, corrélées à certains types de structures chimiques (**Bruneton, 1999 ; Chebaibi et al., 2011**).

L'Algérie, de par sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques à laquelle s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement des cultures intensives des PAM. De même, rares sont les cultures des plantes à parfum qui ont fait l'objet d'études scientifiques très approfondies. Le thym, de la famille des Lamiacées, est un exemple éloquent d'espèce qui n'échappe pas à cette règle. Toutes ces considérations nous ont amené à envisager des possibilités de valorisation de l'essence des thym odorants, en aromathérapie anti-infectieuse, en vue d'offrir une alternative aux ATB.

Notre étude visait un triple objectif :

- Extraction et caractérisation analytique et chromatographique des essences aromatiques du thym récolté à partir d'un champ de culture.
- Évaluation de l'efficacité antibactérienne et antifongique des dites molécules aromatiques *in vitro* vis-à-vis des souches microbiennes, standardisées ou isolées cliniquement, par deux méthodes complémentaires (aromatogramme et micro-atmosphère) en comparaison avec des ATB.



# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

# Chapitre 1

## Huiles essentielles

### 1.1. Historique

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

L'histoire des HE commence cependant 2000 à 3000 ans avant cette époque. Chez les Egyptiens, l'essence de térébenthine était déjà utilisée et tout porte à penser que certains parfums étaient obtenus sous forme d'huiles distillées. L'art de la distillation, initié par les Egyptiens, Indiens et Perses, s'améliora grandement au cours du 9<sup>ème</sup> siècle sous l'impulsion des Arabes avec, notamment, le développement de l'alambic attribué à Avicenne (980-1037).

Durant les siècles qui suivirent, les HE étaient principalement utilisées pour leurs vertus thérapeutiques et ne nécessitaient qu'une production minimale, ce qui n'est plus le cas de nos jours. Avec Paracelse se développèrent l'Alchimie et la notion de "Quintessence" des plantes qui tomba aussitôt dans l'oubli (**Gilly, 1997**).

Il aurait fallu attendre 1928 pour que "l'aromathérapie moderne" soit ressuscitée grâce à un chimiste français, Gatefosse, qui constata les énormes pouvoirs de guérison des HE. Les progrès de la science et des techniques d'analyses permirent de véritables investigations de ces molécules, contribuant au redéploiement international de l'aromathérapie à l'échelle du monde entier (**Roux, 2008**).

### 1.2. Définition générale de l'Huile Essentielle :

Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés, responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés à se solubiliser dans les graisses par leur caractère hydrophobe (**Zhiri et Baudoux, 2005 ; Grosjean, 2011**).

En se référant à la norme française NF T 75-006 (**AFNOR, 2000**), l'HE est défini comme « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par

des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation sèche ». Cette définition, basée sur les procédés d'extraction, est restrictive et exclut aussi bien les produits obtenus par extraction à l'aide de solvants (concrètes et absolues) que ceux obtenus par tout autre procédé (extraction par fluide supercritique (SFE), extraction micro-ondes sans solvant (SFME) (**Roux et Catier, 2007**).

### **1.3. Localisation et rendement**

En pratique, les HE sont principalement extraites de deux types de plantes : les agrumes et les PAM. Parmi les espèces végétales, 10 % seulement sont dites « aromatiques ». La capacité à accumuler l'HE est cependant la propriété de certaines familles de plantes réparties au sein de l'ensemble du règne végétal, aussi bien représentées par la classe des gymnospermes que celle des angiospermes (**Roux et Catier, 2007**).

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

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

Les HE sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des structures histologiques ou glandulaires spécialisées (**Figure 1**), situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule (**Deysson, 1978 ; Festy, 2008 ; Bruneton, 1999 ; Anton et Lobstein, 2005**).

### **1.4 Composition chimique :**

La majorité des HE sont composées de 3 ou 4 molécules majoritaires et de très nombreuses molécules minoritaires. Ces constituants appartiennent, de façon quasi-exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autre part. Actuellement, plus de 3000 constituants ont été isolés à partir des essences (**Bruneton, 1999 ; Carson et Hammer, 2011; Rhind, 2012**).

#### **1.4.1. Les terpènes et terpénoïdes**

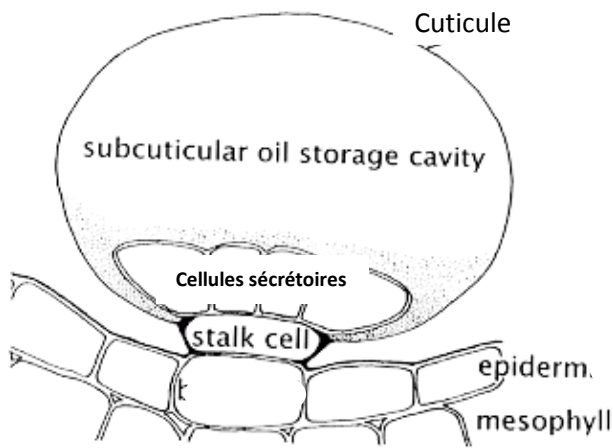
Bien que de structures très diverses, les terpènes ont un caractère commun : ils sont tous formés par la réunion d'unités isopréniques (**Figure 2**). Une classification rationnelle est basée sur le nombre d'unités isopréniques qu'ils renferment. On définit alors les hémiterpènes (1 unité C5), les monoterpènes (2 unités : C10), les sesquiterpènes (3 unités : C15), les diterpènes (4 unités : C20), les sesterpènes (5 unités : C25), les triterpènes (6 unités : C30), les carotènes (8 unités : C40) et les

polyisoprènes (n unités : C<sub>5n</sub>).**(Bruneton, 1999 ; Carson et Hammer, 2011; Rhind, 2012 ; Franchomme et Penoël, 1990).**

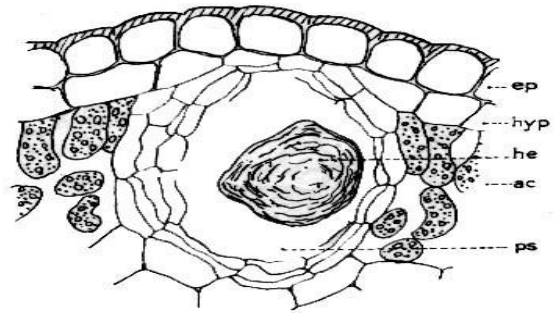
#### **1.4.2. Les composés aromatiques**

Si les composés terpéniques sont les constituants majoritaires des HE, les molécules aromatiques n'en demeurent pas moins des composés importants, à l'exemple du cinnamaldéhyde qui représente environ 75 % de l'HE de cannelle **(Bruneton, 1999).**

Les composés aromatiques sont principalement des dérivés du phénylpropane C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, parmi lesquels se trouvent des aldéhydes (cinnamaldéhyde), des alcools (alcool cinnamique), des phénols (eugenol), des dérivés méthoxy (anethol) ou méthylènedioxy (myristicine).



a) Poil sécréteur glandulaire

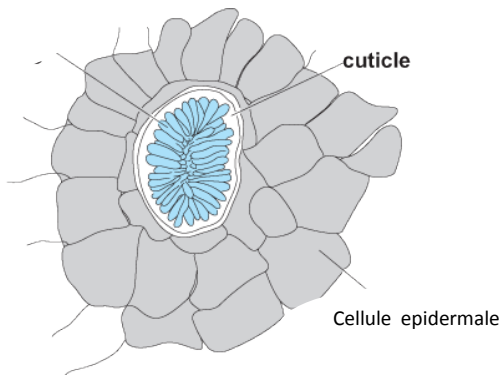


Poche sécrétrice schizolysigène de la feuille de Rue

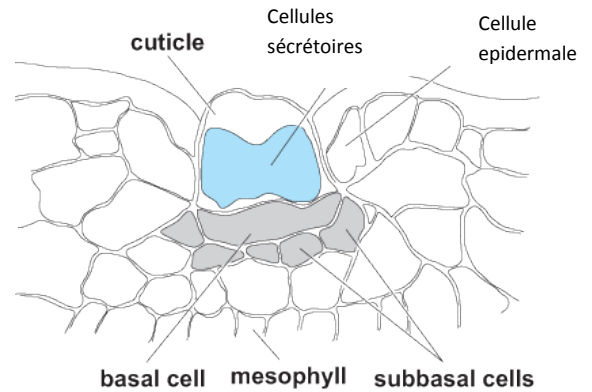
ep : épiderme ; hyp : hypoderme ;  
he : huile essentielle ;  
ac : cellules chlorophylliennes.

b) Poche sécrétrice

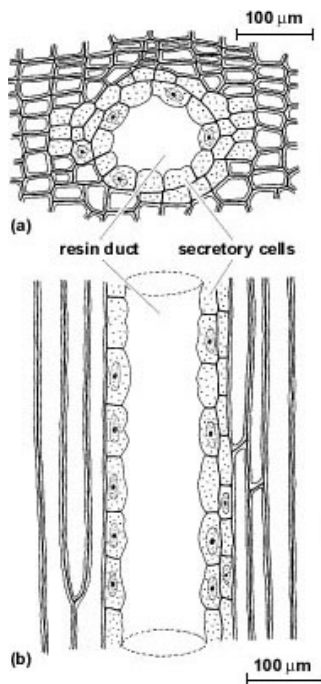
Cellules sécrétoires



c) Cellules sécrétrices épidermiques (vue de face)

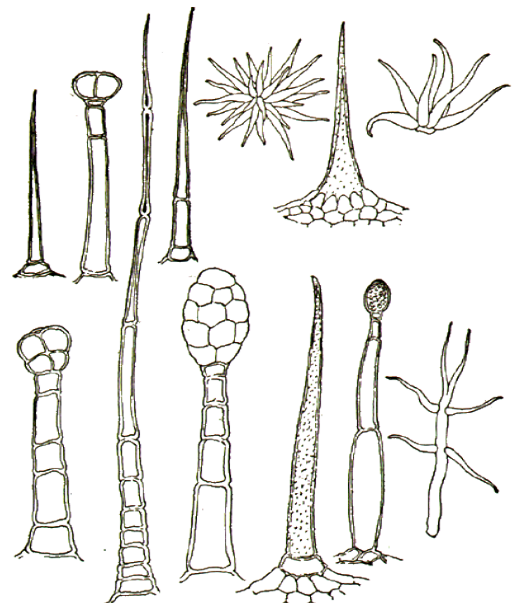


d) Cellules sécrétrices épidermiques (vue de profil)



e) Canal sécréteur

A sample of trichome types:

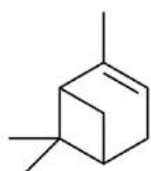


f) Différents types de poils glandulaires

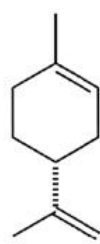
Figure 1 : Structures glandulaires chez les plantes aromatiques

## Terpenes

### Monoterpenes



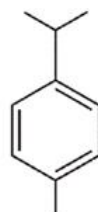
$\alpha$ -Pinene



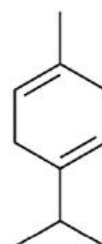
Limonene



Sabinene

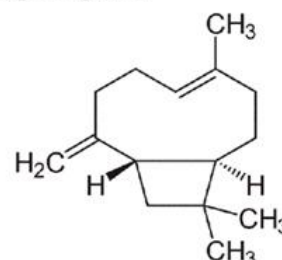


p-Cymene



$\gamma$ -Terpinene

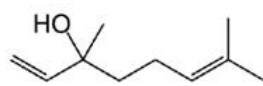
### Sesquiterpenes



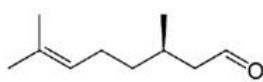
$\beta$ -Caryophyllene

## Terpenoids

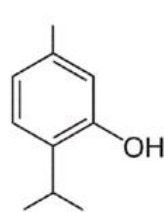
### Monoterpenoids



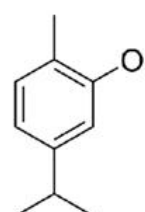
Linalool



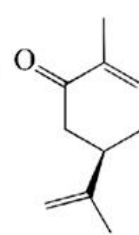
Citronellal



Thymol



Carvacrol

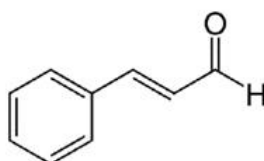


Carvone

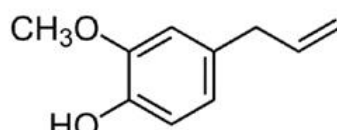


Borneol

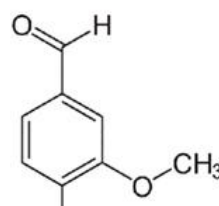
## Phenylpropanoids



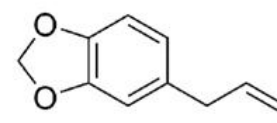
Cinnamaldehyde



Eugenol

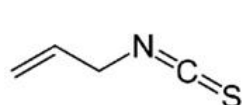


Vanillin

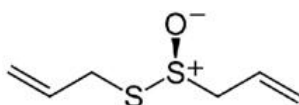


Safrole

## Others



Allyl-isothiocyanate



Allicin

Figure 2 : Principaux composés des huiles essentielles

### 1.5. Profil chromatographique :

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une HE reste cependant son profil chromatographique. Il permet de connaître très exactement sa composition chimique et de rechercher des traces de produits indésirables (pesticides) ou d'éventuelles falsifications.

Le profil correspond à la liste des constituants sélectionnés parmi ceux qui sont représentatifs et caractéristiques d'une HE, accompagnée, pour chacun d'eux, de limites de concentration et, éventuellement, des rapports entre concentrations.

Un constituant est dit représentatif lorsqu'il est présent dans tous les échantillons à une concentration dont la dispersion statistique est sensiblement gaussienne (Gilly, 1997 ; Lis-Balchin, 2006).

### **1.6. Notion du Chémotype :**

Le chémotype, également appelé chimiotype, permet de définir la ou les molécules biologiquement actives majoritairement présentes dans l'HE (Duraffourd et Lapraz, 2002).

La mise en évidence du chémotype s'explique par le fait qu'une même plante aromatique, définie botaniquement, synthétise une essence qui sera biochimiquement différente en fonction du biotope dans lequel elle se développe bien que leur morphologie ainsi que leur génétique ne soient pas substantiellement transformées, seul leur phénotype chimique est mouvant. Cette notion de chémotype est fondamentale en aromathérapie car les indications thérapeutiques qui découlent de ces divers éléments chimiques peuvent être différentes (Zhiri et Baudoux, 2005).

### **1.7. Propriétés physiques :**

Liquides à température ambiante, les HE sont volatiles et ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (exceptée pour celle du girofle et de cannelle). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques et des matières grasses qui lui servent d'excipients. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation et doivent donc être conservées dans un flacon en verre teinté au bouchon étanche (Bruneton, 1999 ; Duraffourd et Lapraz, 2002).

### **1.8. Voies d'administration :**

Différentes voies d'administration peuvent être distinguées :

- La voie olfactive où les molécules aromatiques sont captées par l'épithélium olfactif pour être transmises au cerveau émotionnel et où chaque odeur est lue comme plaisante ou déplaisante, attirante ou repoussante.
- La voie cutanée où les HE sont facilement absorbées par la peau en raison de leur grande affinité pour les lipides. Pour cela, il est possible d'incorporer les HE dans les crèmes, gels et huiles végétales.
- La voie orale qui est une voie majeure dans le cadre des traitements sérieux.
- Les voies rectale et vaginale via des suppositoires, recommandées surtout en pédiatrie afin de court-circuiter le système digestif (Belaiche, 1979 ; Lardry et Haberkorn, 2007 ; Festy, 2008 ; Grosjean, 2011).

### **1.9. Toxicité :**

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits phytopharmaceutiques, celle des HE est moins investiguée. Les interactions de ces produits avec les

médicaments sont aussi peu mentionnées. On trouve cependant quelques informations sur les toxicités suivantes :

#### **1.9.1. Toxicité par ingestion :**

La toxicité d'une HE peut être fixée par la détermination de la Dose Létale 50 (DL50). Les HE d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible avec des DL50 supérieures à 5 g/kg sauf pour la sarriette et l'origan (DL50 = 1.4 g/kg). D'autres ont une DL50 inférieure à 1g/kg (boldo = 0.13 g/kg ; moutarde = 0.34 g/kg; basilic, estragon et hysope = 1.5 ml/kg) tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (**Bruneton, 1999;Roux, 2008**).

#### **1.9.2. Toxicité dermique :**

Le thym, l'origan et la sarriette sont connus pour leur pouvoir irritant, l'angélique et la bergamote sont photo sensibilisantes alors que la cannelle est dermocaustique et allergisante (**Martini, 2011**).

#### **1.9.3. Toxicité selon la composition :**

Une utilisation prolongée des essences à thuyones (thuya, absinthe, sauge officinale) est neurotoxique. En effet, ces substances cétoniques induisent des troubles psychiques et sensoriels. D'autres monoterpènes sont toxiques à fortes doses : camphre, menthol, cinéol et anéthol. Les phénols sont dermatotoxiques et hépatotoxiques. Elles brûlent la peau et détruisent les cellules hépatiques (**Mathieu et Fonteneau, 2008**).

#### **1.10. Domaines d'utilisation des Huiles essentielles :**

La composition chimique des HE confère à ces extraits aussi bien des propriétés odorantes et aromatiques qu'antimicrobiennes. Ces caractéristiques offrent des débouchés importants dans de nombreux domaines.

#### **1.10.1. Aromathérapie :**

Branche de la phytothérapie, l'aromathérapie a acquis ses lettres de noblesse et est devenue une thérapeutique à part entière. Si l'on se réfère à l'acception étymologique et moderne du terme, l'aromathérapie se définit comme: *« le traitement, à titre préventif ou curatif, des maladies physiques et psychosomatiques par les “arômes végétaux” : les huiles essentielles et les essences extraites des plantes odoriférantes qui possèdent des vertus médicinales sont administrées par les différentes voies compatibles avec leur nature huileuse »*.

Les HE diffèrent fondamentalement des antibiotiques qui sont par définition des substances mortes, hostiles à la vie et perturbatrices des métabolismes naturels vitaux. Au contraire, les HE sont des «eubiotiques» dépourvus d'effets secondaires, qui améliorent le terrain et «participent à la vie» en favorisant une profonde revitalisation de l'organisme (**Zhiri et Baudoux, 2005**).



Actuellement, un retour très net aux HE pour la désinfection et le traitement des maladies infectieuses a été signalé. Ce retour est stimulé par le danger que représente l'usage de certains ATB. Les HE ont une efficacité durable sans aucune résistance contrairement aux ATB. Deux récepteurs offrent un abord évident quant à la puissance des huiles : la peau et la sphère oto-rhino laryngologique et broncho-pulmonaire (**Franchomme, 1981**). Cette efficacité est due au fait qu'elles contiennent plus de 20 molécules actives différentes, tandis que dans le médicament de synthèse, on ne peut évaluer les interactions de plus de trois molécules. Les HE ont donc une action globale, un « large spectre » sur l'ensemble de la physiologie.

Si beaucoup de monde limite l'aromathérapie à la lutte anti-infectieuse, plusieurs études attribuent aux HE de nombreuses propriétés thérapeutiques. Beaucoup soulageront diverses douleurs (action anti-inflammatoire, antalgique, antispasmodique). Certaines possèdent des propriétés stimulantes et ré-équilibrantes de grandes fonctions : détoxification par stimulation de l'élimination des déchets, régulation des systèmes hormonaux et nerveux, de la digestion, de la circulation, etc.

Mais il serait dommage de restreindre l'utilisation des HE sur le plan physique et de ne voir en elles qu'une action moléculaire. C'est sur ce plan psychologique qu'il reste sans doute le plus à découvrir au sujet des HE (**Lis-Balchi, 2006 ; Edris, 2007 ; Festy, 2008 ; Steflitsch et Steflitsch, 2008 ; Aiache et al., 2011**).

#### **1.10.2. Médecine dentaire :**

Plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire et les infections oropharyngées (**Pellecuer et al., 1980**).

En médecine dentaire, l'exemple le plus couramment utilisé est la listerine: solution constituée d'HE de thymol et d'eucalyptol utilisée pour le lavage de la cavité orale et des dents et qui possède une activité bactéricide sur les microorganismes de la salive et de la plaque dentaire (**Lamendin et al., 2004 ; Lamendin, 2008**).

#### **1.10.3. Utilisation en aéro-ionisation et désinfection des ambiances :**

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

En milieu hospitalier, l'assainissement de l'atmosphère d'une pièce est réalisé par la diffusion des HE. C'est un procédé permettant de répandre un brouillard (microgouttelettes d'HE) de molécules actives potentiellement antibactériennes, antivirales et immunostimulantes. Cette diffusion atmosphérique s'effectue à l'aide de diffuseurs adaptés.

#### **1.10.4. Industrie agroalimentaire :**

Depuis peu, les industriels ont souhaité l'utilisation d'HE comme conservateurs, au détriment des molécules de synthèse classiques couramment utilisées, telles que les parabènes. Plusieurs travaux ont montré que les HE de thym, de cannelle, d'origan et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables d'infections alimentaires (**Hulin et al., 1998 ; Burt, 2004 ; Dorman et Deans, 2000**).

#### **1.10.5. Industries pharmaceutiques**

L'intérêt des HE dans l'industrie pharmaceutique s'agrandit avec de nouvelles perspectives de les utiliser comme principes actifs (**Bardeau, 2009**).

Ce sont principalement les propriétés antiseptiques et antifongiques qui sont reconnues. Différentes spécialités pharmaceutiques sont sur le marché. La tendance actuelle serait l'utilisation bénéfique de cette activité antiseptique. Des travaux récents soulignent l'apport bénéfique des HE face aux infections nosocomiales bactériennes dont les souches sont résistantes aux antibiotiques utilisés traditionnellement.

De nombreuses HE, comme les huiles de cannelle, de piment, de laurier et d'origan, présentent un pouvoir antioxydant (**Edris, 2007**).

#### **1.10.6. Parfumerie et cosmétologie :**

Un grand nombre d'HE est utilisé dans l'élaboration de la majorité des parfums et produits de toilette. Ces essences servent à préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante tout en leur assurant une odeur agréable (**Aquino, 2002; Martini, 2011**).

### **1.11. Procédés et équipements d'extraction des huiles essentielles :**

#### **1.11.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :**

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable (**Figure 3a**). Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées dans l'essencier avant d'être séparées en une phase aqueuse (HA) et une phase organique (HE). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (**Walton et Brown, 1999; Janardhanan, 2004 Raaman, 2006**).

#### **1.11.2. Extraction par hydrodistillation :**

Elle consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau et l'ensemble est porté à ébullition. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. De plus, ces procédés présentent des inconvénients dus principalement à l'action de la vapeur d'eau ou de l'eau à l'ébullition, certains

organes végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation (**Garnéro, 1996 ; Raaman, 2006**).

### **1.11.3. L'extraction assistée par micro-ondes**

L'avantage de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et incrémenter le rendement. Toutefois, aucun développement industriel n'a été réalisé à ce jour.

La distillation assistée par microonde (**Figure 3b**) fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée parce qu'elle présente beaucoup d'avantages : technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (**Lahlou, 2004; Lucchesietal., 2004; Chemat et al., 2013**).

### **1.11.4. Expression à froid :**

La technique est réservée à l'extraction des essences volatiles contenues dans les péricarpes d'agrumes en déchirant ces dernières par un traitement mécanique. Elle consiste à rompre ou dilacérer les parois des sacs oléifères contenus dans le mésocarpe situé juste sous l'écorce du fruit, l'épicarpe, pour en recueillir le contenu qui n'a subi aucune modification (**Bruneton, 1999**).

### **1.11.5. Extraction par solvant organique :**

L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances.

### **1.11.6. Extraction par fluide à l'état supercritique :**

La SFE est une technique dite « verte » utilisant pas ou peu de solvant organique et présentant l'avantage d'être bien plus rapide que les méthodes traditionnelles, en offrant également la possibilité de manipuler la composition de l'extrait. Les compositions chimiques des huiles essentielles ainsi obtenues peuvent présenter des différences qualitatives et quantitatives avec celles issues de l'hydrodistillation (**Yang et al., 2007; Leszczynska, 2007**).

## **1.12. Contrôle de qualité et normalisation :**

L'importance et le développement du marché des HE s'expliquent par le nombre et la diversité des domaines d'application de ces extraits. Ils induisent aussi la nécessité de proposer des méthodes de contrôle analytique garantissant leurs caractéristiques.

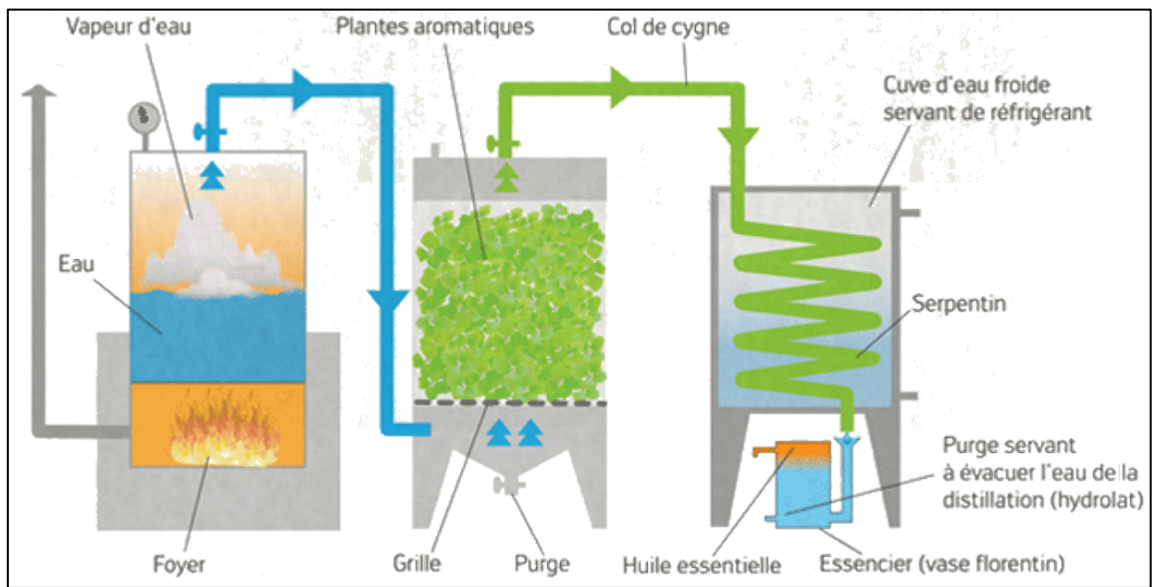
C'est pourquoi, ces extraits font l'objet de nombreuses analyses dont les objectifs principaux sont la caractérisation des substances composant l'HE ou la découverte de nouvelles molécules, mais

également le contrôle qualité et la recherche d'adultération dans un milieu où la fraude est tentante, notamment à cause des enjeux économiques.

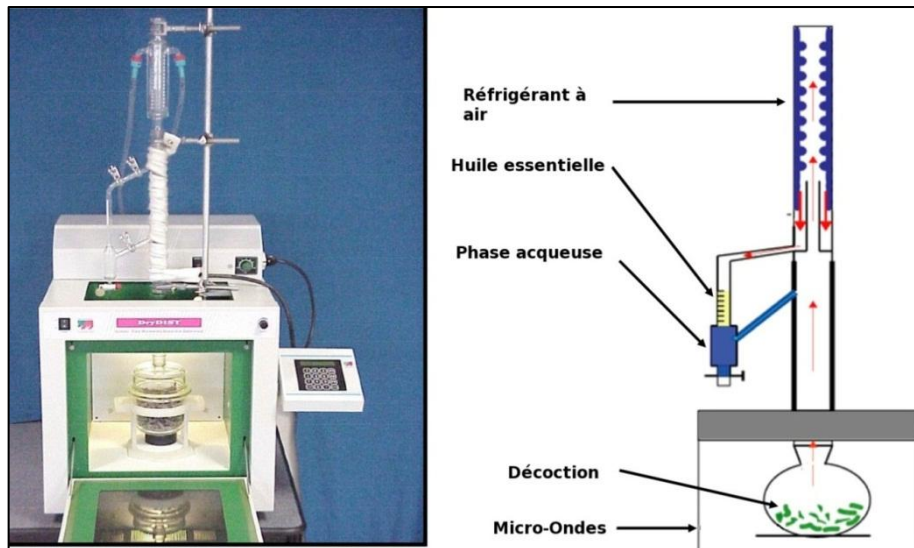
Les nombreux paramètres intervenant dans la composition des HE ont amené les organismes de normalisation à imposer un certain nombre de règles qui concernent principalement les caractéristiques physico-chimiques, les propriétés organoleptiques, le profil chromatographique et la quantification relative des différents constituants (**AFNOR, 2000**).

Les méthodes de détermination des caractéristiques physico-chimiques à utiliser sont décrites avec précision dans le recueil de normes publiées par l'Association Française de Normalisation (**AFNOR, 2000**), elles-mêmes identiques aux normes internationales de l'ISO.

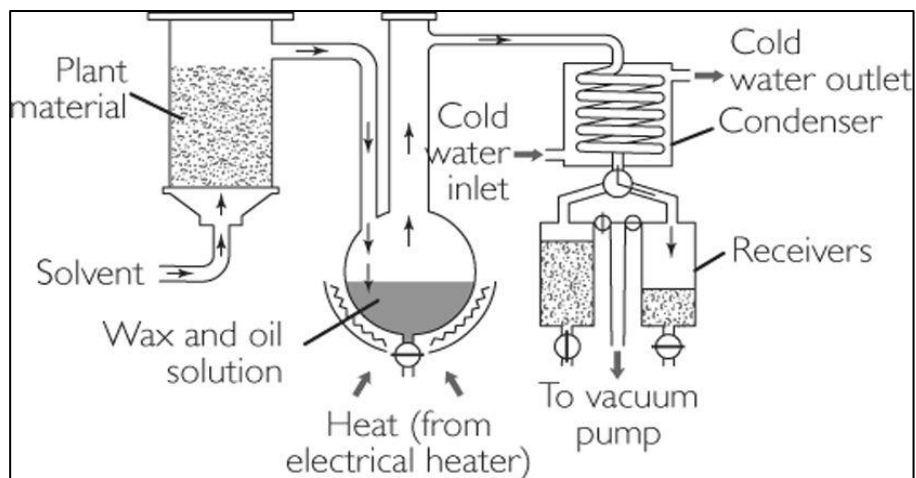
Les points de contrôles à effectuer pour se prémunir de la falsification des HE concernent l'origine géographique, l'espèce botanique, l'organe producteur (feuilles, fleurs, fruits, écorces...), les caractéristiques organoleptiques (couleur, odeur, densité et indice de réfraction). En plus de ces points de contrôle, on peut conclure que la meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une HE se base sur le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître exactement la composition chimique et de chercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels les pesticides ou des produits chimiques ajoutés (**Dris et Jain, 2004**).



a) Extraction des HE par entrainement à la vapeur d'eau



b) Extraction des HE par micro-ondes (ferhat, 2006)



c) Extraction des HE par solvant organique

Figure 3 : Quelques techniques d'extraction des huiles essentielles

## Chapitre 2

### Monographie de la plante étudiée : *Thymus vulgaris*

#### 2.1. Historique et description botanique :

Depuis longtemps, le Thym a toujours accompagné la vie quotidienne des humains, tant pour ses usages médicaux et cosmétiques que culinaires. Les sumériens et les égyptiens de l'antiquité l'utilisaient pour embaumer leurs morts (processus de momification). Chez les romains, on faisait brûler du Thym pour purifier l'air et éloigner les animaux nuisibles. Le nom Thym provient du mot Grec « thymos » qui veut dire odeur, et à ce titre le Thym est très largement utilisé en qualité de plante aromatique, en particulier dans la cuisine méditerranéenne en tant que condiment (**Richard, 1985**).

Le Thym est une plante vivace rampante (**Figure 4**), à très petites feuilles persistantes et odoriférantes, utilisées comme aromates. C'est un sous-arbrisseau vivace à tiges grêles. Il se multiplie au printemps par semis, par bouturage ou par division des touffes. Il s'accommode de tous les terrains, mêmes humides. L'exposition au soleil est recommandée, car il a besoin de lumière et de chaleur.

*Thymus vulgaris* L. est un arbuste aromatique à tiges ramifiées, pouvant atteindre 40 cm d'hauteur. Il possède de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert foncés, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichome). Les trichomes contiennent l'HE majoritairement composée de monoterpènes. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet.

#### 2.2. Classification

Le Thym appartient à la famille des *Lamiacées*. C'est l'une des familles botaniques les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antioxydant et antibactérien. Elle regroupe entre 200 et 250 genres et entre 3200 et 6500 espèces (**Richard, 2006**).

*Thymus* est l'un des huit genres les plus importants en ce qui concerne le nombre d'espèces chez la famille *Labiatae*, bien que le nombre d'espèce de ce genre change selon le point de vue taxonomique ; si nous adoptons un caractère synthétique, il comporte plus de 200 espèces (**Morales, 1997**). Selon la classification d'**Engler (1924)**, le Thym appartient au :

**Tableau 1** : Classification botanique du Thym

| <b>Règne</b>       | <b>Plante</b>          |
|--------------------|------------------------|
| Embranchement      | Spermaphyte            |
| Sous embranchement | Angiosperme            |
| Classe             | Magnoliopsida          |
| Sous classe        | Métaclamydées          |
| Ordre              | Tubiflorale            |
| Famille            | Lamiacées              |
| Sous famille       | Stachyoidea            |
| Genre              | <i>Thymus</i>          |
| Espèce             | <i>Thymus vulgaris</i> |





Figure 4 : *Thymus vulgaris* : Aspects botanique (images.google.fr)



### 2.3. Variabilité et origine

Le genre *Thymus* est à détermination toujours délicate en raison de l'extrême variabilité des espèces et des hybridations interspécifiques (Quezel et Santa, 1963). Environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen. En Europe, il existe plus de 40 espèces différentes. C'est pour cela que l'on peut considérer la région méditerranéenne comme le centre de ce genre (Nickavar, 2006).

### 2.4. Répartition géographique

#### Dans le monde

Il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée. C'est une plante très répandue dans le Nord-Ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye) (Figure 5). Elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du Sud-Ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya (Dob, 2006) (Annexe2).

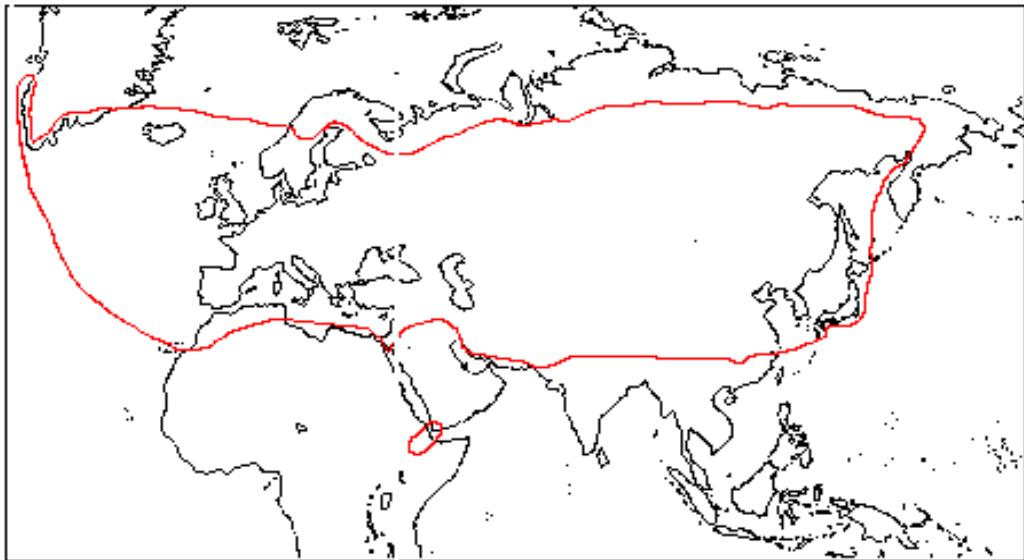


Figure 5: Répartition du Thym dans le monde (Stahl, 1991).

#### En Algérie

Pour l'Algérie, Quezel et Santa 1963, décrivent 12 espèces de Thym dont 9 sont endémiques à l'Algérie et à l'Afrique du Nord (Quezel et Santa, 1963).

Le genre *Thymus* inclut environ 300 espèces à travers le monde dont 11 localisées en Algérie et 9 d'entre elles sont endémiques. Ces espèces sont réparties du Nord algérois à l'Atlas saharien, et du Constantinois à l'Oranais (Kabouche, 2005).

## 2.5. Composition chimique de Thym

La botanique de la plante à partir de laquelle on distille l'HE est la partie aérienne. Mais très généralement, l'essence est extraite à partir de deux organes principaux à savoir : les fleurs et feuilles.

La variabilité chimique des HE du Thym dépend de plusieurs facteurs, qui généralement sont d'ordre climatique et environnemental, mais ils peuvent être aussi d'ordre génétique et saisonnier (stade végétatif). C'est ainsi qu'une étude sur le Thym d'Afrique du Nord a démontré que le composé majoritaire était le thymol chez les espèces d'Algérie et du Maroc, et le carvacrol chez les espèces de Tunisie (**Dob, 2006**).

## 2.6. Utilisations

Le Thym a plusieurs utilisations (**Festy, 2008**), parmi lesquelles on peut citer :

- Confection de savons, cosmétiques divers et détergents.
- usage reconnu pour soulager les symptômes de la bronchite, inflammation des voies respiratoires, traiter la stomatite, troubles gastro-intestinaux et les blessures cutanées légères.
- aromatiser et donner la saveur à quelques aliments : viande, conserve, sauce, condiment, ...etc.
- le Thym produit un miel distinctif qui commence à trouver des marchés de place en Europe et en Asie.

### 2.6.1. Activité antioxydante

Récemment, il a été observé que le Thym a une activité antioxydante. Cette propriété est due essentiellement à la présence de composés phénoliques naturels (**Ramarathnam et al., 1995**).

En effet, les herbes culinaires séchées tels que le Thym et l'Origan contiennent des concentrations très élevées en antioxydants (dépassant les  $7,5 \text{ mmol.g}^{-1}$ ) (**Dragland et al., 2003**).

## Chapitre 3

### Activité antimicrobienne des huiles essentielles

#### 3.1. Historique

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

De nombreuses études traitent de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès d'aromathérapie scientifique.

#### 3.2. Activité antibactérienne

##### 3.2.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales bactéricides

Il est nécessaire de définir, pour caractériser l'activité antimicrobienne d'un composé, des paramètres simples. Pour l'activité antibactérienne, le plus courant est la « Concentration Minimale Inhibitrice » (CMI) qui peut être déterminé par contact direct en milieu gélosé ou en milieu liquide. Elle correspond à la concentration nécessaire pour inhiber totalement la croissance d'un nombre déterminé de germes après un temps d'incubation donné (**Hulin et al., 1998**).

Fréquemment, la CMI n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur. Ceci a amené à définir un autre paramètre : la « Concentration Minimale Bactéricide » (CMB), parfois appelée aussi « létale » (CML). Elle correspond à la concentration en agent inhibiteur nécessaire pour que l'activité bactéricide soit totale sur un inoculum donné après un temps bien déterminé. Elle est estimée en milieu liquide par l'évaluation des survivants après élimination du composé inhibiteur (**Davidson et Parish, 1989**).

##### 3.2.2. Bactéricidie et bactériostase

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

L'activité des HE est souvent assimilée à une activité bactériostatique. Cependant les études suivantes ont montré que certains constituants chimiques des HE ont des propriétés bactéricides (**Kunle et al., 2003, Carson et Riley, 1995, Lambert et al., 2001, Walsh et al., 2003**) et fongicides (**Hammer et al., 2003**).

Plus spécifiquement, plusieurs études ont montré l'apparition de fuites d'ions potassium  $K^+$  de cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec du Tea-tree (*Melaleuca alternifolia*). Il s'agit de la toute première indication de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Des composés isolés tels le thymol et le carvacrol rendent la membrane des bactéries perméable, prémices de leur mort (Helander et al., 1998; Lambert et al., 2001). La faculté de perturber la perméabilité de la cellule membranaire, accompagnée de la perte de l'osmose chimique sont bien la preuve d'une activité létale de certaines HE (Cox et al., 2000).

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

### 3.2.3. Souches microbiennes

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé car une HE peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, bactériostatiques vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet (Hermal, 1993). C'est pour cela qu'il est important de mentionner la dénomination complète ainsi que le Gram des microorganismes ainsi que l'espèce botanique et le chémotype de l'huile essentielle (Pibiri, 2006).

### 3.2.4. Rôle de la méthode dans la détermination de l'activité

Selon la littérature, la diffusion sur gélose et la dispersion en microatmosphères mettent en évidence l'activité biostatique (Hermal, 1993), et les mélanges en bouillon nutritif, l'activité biocide (Sarbach, 1962). Mais des études récentes se sont affranchies de la méthodologie et des essais gélosés peuvent aussi bien démontrer des effets biocides (Sivropoulou et al., 1996).

### 3.2.5. Association d'huiles essentielles

Les effets antimicrobiens des associations d'HE, comme pour les associations d'antibiotiques, sont définies selon quatre interactions possibles :

- Indifférence : l'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre.
- Addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.
- Synergie : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration.
- Antagonisme : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle prise séparément.

### 3.2.6. Activité liée à la composition chimique

L'activité biologique d'une HE est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant.

L'activité des HE est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Evalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (**Lahlou, 2004**).

Les molécules réputées actives sont des terpénoïdes, car les hydrocarbures saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et de leur faible solubilité (**Griffin et al., 1999**). L'effet des terpénoïdes sur des membranes bactériennes isolées suggère que leur activité est fonction des propriétés lipophiles des constituants terpéniques, la nature des groupes fonctionnels, leur solubilité en phase aqueuse et la stéréochimie de la molécule (**Dorman et Deans, 2000**).

Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont des phénols (thymol, carvacrol et eugénol) des alcools, ( $\alpha$ -terpinéol, terpinen-4-ol, linalool), des aldéhydes, des cétones et plus rarement des terpènes (**Cosentino et al., 1999; Dorman et Deans, 2000, Valero et Salmeron, 2003**).

### 3.2.7. Méthodes de détermination de l'activité

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des HE. L'insolubilité des huiles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une explication de la variété des techniques.

Selon la souche microbienne, l'HE et l'application choisie, divers milieux de culture peuvent être mis en œuvre. Les différents protocoles peuvent ainsi être classés :

- selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile, soit liquide, solide ou gazeuse,
- selon la nature du contact de l'huile avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsifiant.

Ces différentes techniques sont répertoriés et décrites dans différentes publications (**Zaika, 1988; Lahlou, 2004, Arnal-Schnebel et al., 2004, Lin et al., 2005, Singh et al., 2006**).

# **LA PARTIE EXPERIMENTALE**

## **Chapitre 4**

### **Matériel et Méthodes**

Notre étude s'est étalée sur une période de 3 mois, d'Avril jusqu'à Juin 2013. Les différentes expérimentations ont été effectuées dans les structures suivantes :

- Laboratoire de bactériologie de l'établissement publique hospitalier de Boufarik, Blida.
- Laboratoire de chimie organique de la faculté de chimie de l'USTHB, Alger.

#### **4.1. Matériel :**

##### **4.1.1. Matériel végétal : Collection et préparation**

Nous avons utilisé la partie aérienne fraîche de *Thymus vulgaris* (feuilles et tiges) récoltée au niveau de la région de Larbaa (wilaya de Blida). La collecte a été faite le matin à la fin du mois d'Avril 2013 pour l'extraction des essences aromatiques à l'échelle du laboratoire. La quantité de la matière fraîche utilisée est environ (1Kg).

L'identité, la nomenclature et la systématique de la plante ont été confirmées au niveau du Jardin d'Essais d'El Hama (Alger) en comparaison avec des spécimens déposés dans l'herbier.

##### **4.1.2. Souches microbiennes étudiées**

Pour mettre en évidence le caractère antimicrobien de l'huile essentielle, nous avons utilisé 15 souches bactériennes et 5 souches fongiques (Tableau 2). Certaines souches sont de référence ATCC (American Type Culture Collection) et d'autres ont été isolées cliniquement.

Les souches bactériennes entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24 heures à 37°C et par la suite ensemencées dans de l'eau physiologique pour l'obtention des suspensions microbiennes.

##### **4.1.3. Milieux de culture**

Nous avons principalement utilisé la gélose Muller-Hinton (MH), la Gélose Nutritive (GN) ainsi que la gélose Sabouraud au chloramphénicol (SAB).

**Tableau 2 :** Souches bactérienne et fongique utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

| Souches microbiennes           | Origine            |
|--------------------------------|--------------------|
| <b>Gram +</b>                  |                    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | ATCC6538           |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | Pus                |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | ECBU               |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | Hémoculture        |
| <i>Enterococcus spp.</i>       | -                  |
| <b>Gram -</b>                  |                    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | ECBU               |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | ATCC 9027          |
| <i>Escherichia coli</i> (Ec1)  | ATCC 4157          |
| <i>E. coli</i>                 | ECBU               |
| <i>E. coli</i>                 | Infection urinaire |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | Pus                |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | Infection urinaire |
| <i>Serratiaspp.</i>            | Pus                |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Hémoculture        |
| <i>Salmonella typhimurium</i>  | -                  |
| <b>Champignons</b>             |                    |
| <i>Aspergillus flavus</i>      | Air                |
| <i>Aspergillus terreus</i>     | Air                |
| <i>Penicillium spp.</i>        | Air                |
| <i>Candida albicans</i>        | Pus de gorge       |
| <i>Candida parapsilosis</i>    | Ongle              |

ATCC : American Type Culture Collection; ECBU: Examen Cytobactériologique des Urines ; (-) non spécifié.

## 4.2. Méthodes :

### 4.2.1. Protocole d'extraction de l'huile essentielle : Hydrodistillation

Afin de mettre en place un protocole applicable à l'extraction des essences aromatiques et de l'optimiser tout en conservant la qualité de l'huile extraite, nous avons opté pour l'hydrodistillation eu



égard des multiples avantages qu'elle offre vis-à-vis de l'entraînement à la vapeur d'eau (non étanchéité du dispositif conduit à des pertes de rendement).

#### 4.2.2. Extraction des huiles essentielles :

L'hydrodistillation de l'HE du Thym a été accomplie à l'aide d'un dispositif de type **Clevenger (1928)**. Le montage utilisé est présenté dans la **figure 6**.



**Figure 6 :** Montage de l'appareil de **Clevenger (1928)**

1 : Calotte chauffante ; 2 : Ballon de 2 litres (eau + matière végétale) ; 3 : Colonne en verre ; 4 : Réfrigérant ; 5 : Robinet réglable ; 6 : Support métallique ; 7 : Entrée eau froide ; 8 : Sortie eau chaude.

La procédure d'extraction se résume à porter à ébullition une quantité de 100gde matériel végétal sèche pendant 2h avec 700mL d'eau distillée dans un ballon de 1 litre surmonté d'une colonne de 60cm de longueur reliée à un réfrigérant tout en s'assurant de l'étanchéité de l'appareillage.

Ce système permet d'effectuer des prélèvements horaires sur les phases aqueuse et organique destinés aux mesures de la cinétique d'hydrodistillation. Un simple robinet au bas permet de recueillir l'HE à la fin de la réaction.

#### 4.2.3. Isolation des huiles essentielles :

La vapeur condensée obtenue conduit à deux phases :

- une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'eau par simple décantation et à laquelle on ajoute du sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ) pour éliminer les traces d'eau. L'efficacité de cette opération peut être accrue par une étape préalable de relargage (adjonction du chlorure de sodium) qui permet une bonne séparation entre les 2 phases non miscibles en diminuant la solubilité

des HE dans l'eau. La quantité d'essence obtenue est alors pesée pour le calcul du rendement. Aucun solvant organique n'est utilisé au cours de ce protocole.

- une phase aqueuse (eau aromatique ou hydrolat) qui contient une quantité non négligeable d'essence soit sous forme solubilisée ou sous forme de fines gouttelettes dispersées.

-

#### **4.2.4. Calcul du rendement en huile essentielle :**

On définit le rendement en huiles essentielles comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée ( $M_{HE}$ ) à la masse de la matière végétale séché (MS) ou humide (MH), exprimé dans les mêmes unités de masse. Le rendement (**R**) en huile essentielle, exprimé en pourcentage est donné par la relation suivante :

$$\mathbf{R \% = M_{HE} / MS *100}$$

Par ailleurs l'expression (1) est la plus couramment utilisée car elle fait intervenir un paramètre important lié à la matière végétale qui est le taux d'humidité.

Ainsi, les HE seront conservées au réfrigérateur (4°C) dans des récipients étanches jusqu'à leur nouvelle utilisation.

#### **2.2.5. Étude analytique de l'huile essentielle:**

Les nombreux paramètres intervenant dans la composition des HE ont amené les organismes de normalisation à édicter un certain nombre de règles qui concernent les propriétés organoleptiques, physico-chimiques et le profil chromatographique.

##### **a) Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle:**

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) de l'essence du *Thymus vulgaris* ont été notées.

##### **b) Mesure des grandeurs physiques :**

###### **- Détermination de la densité relative à 20°C ( $d^{20}$ ) : (AFNOR, 2000)**

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'une huile essentielle à 20°C, à la masse d'un volume égal d'eau à 20°C. Elle constitue un point de repère important.

###### **Mode opératoire et calcul :**

Les méthodes homologuées prévoient l'utilisation d'un pycnomètre ou d'un densimètre automatique pour la mesure de cette constante. Or dans notre pratique courante et par manque d'une quantité suffisante d'HE, nous étions dans l'obligation de procéder par une méthode de routine qui consistait à prélever par une micropipette un volume de 1 ml et de le peser avec une balance analytique de précision en prenant en considération le coefficient de correction de température :

$$d^{20} = (m \text{ HE} / m \text{ H}_2\text{O}) + (0,00073 * (T^\circ \text{ échant} - 20))$$

Où m : la masse en gramme.

- **Détermination de l'indice de réfraction :** (AFNOR NF ISO 280 : 1999 (75-112))

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante.

**Mode opératoire et calcul :**

Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1,333 à 20°C. Après ouverture du prisme secondaire nous déposons 2 gouttes d'HE sur la partie centrale du prisme principal et nous fermons ensuite doucement le prisme secondaire ce qui permettra à l'HE de s'étaler entre les prismes principal et secondaire en un film mince.

La lecture de la mesure s'effectue à une température stable et cette valeur sera modifiée suivant le changement de température.

L'indice de réfraction IR, à la température de référence t, est donné par l'équation suivante :

$$(IR) = n t' + 0,0004 (t-t')$$

Où nt : valeur de lecture, obtenue à la température t', à laquelle a été effectuée la détermination.

**2.2.6. Analyses chromatographiques de la fraction aromatique :**

**a) Principe de la CG-SM :**

Le spectromètre de masse couplé à un chromatographe en phase gazeuse permet d'identifier et de quantifier les constituants d'un mélange de molécules volatiles.

En soumettant une HE à la CG-SM, nous déclenchons un processus à plusieurs étapes :

- ionisation des molécules qui se volatilisent sous l'effet de la haute température.
- accélération des ions formés qui se dirigent vers le dispositif de séparation.
- séparation des ions et leur distribution suivant leur rapport masse /charge et leur détection.
- traitement du signal : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports m/z.

La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs « bibliothèques » de référence permet son identification. Ce couplage augmente considérablement la quantité et la qualité des informations obtenues.

- **Conditions opératoires de la CG-SM :**

Les analyses chromatographiques des HE ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse type Hewlett-Packard (6890) couplé avec un spectromètre de masse (HP 5973).

La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30mx0,25mm), l'épaisseur du film est de 0,25µm. La température de la colonne est programmée de 50 à 250°C à raison de 4°C.min<sup>-1</sup>. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5 ml.min<sup>-1</sup>. Le mode d'injection est du mode split (rapport de fuite : 1/70). L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98 et piloté par un logiciel « *HP ChemStation* » permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

#### **Identification des constituants :**

L'identification des constituants a été faite sur la base de la comparaison de leurs indices de rétention avec ceux des composés de référence de la littérature. Une confirmation est apportée à l'aide des spectres de masse en comparaison avec ceux des composés standard de la banque de données informatisée (NIST 98).

La préparation de la table des n-alcane pour la mesure des indices de Kovats des composés identifiés dans l'huiles essentielle a été faite comme suit : Solution des n-alcane de C<sub>8</sub> à C<sub>26</sub> (origine: Aldrich et FlukaChemicals) à 5% dans le pentane. Soit 0,1 g de chaque alcane dans 20 ml de pentane, conservé au réfrigérateur. L'identification des composés a été effectuée par comparaison de leurs indices de rétention (indices de Kovats) et des spectres de masse ions-fragments caractéristiques obtenus expérimentalement à ceux cités dans la littérature et/ ou inventoriés dans les banques de bibliothèques spectrales (Wiley7, Nist 2002).

Les indices de Kovats (IK) sont calculés selon la formule suivante :

$$IK = 100 n + 100 * (TR_c - TR_n / TR_{n+1} - TR_n)$$

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

**TR<sub>c</sub>** : Temps de rétention du composé ;

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

**TR<sub>n+1</sub>** : Temps de rétention de l'alcane à **n+1** atomes de carbone élué après le composé.

#### **2.2.7. Étude de l'activité antimicrobienne des HE:**

La recherche de l'activité antimicrobienne et antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes soumis en contact avec l'HE du Thym. Dans ce test, deux méthodes ont été effectuées : Aromatogramme (technique en milieu solide) et Micro atmosphère (méthode en phase vapeur).

##### **2.2.7.1. Technique en milieu solide : Méthode des aromatogrammes**

Cette méthode utilisée par certains auteurs (**Benjlali et al, 1986 ; Satrani et al, 2007**) est la technique que nous avons utilisée pour évaluer dans un premier temps l'activité antimicrobienne de l'HE du Thym.

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou méthode des disques. Elle a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des produits à tester, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale.

Cette technique, inspirée de celle des antibiogrammes, a été généralisée aux HE issues de l'hydrodistillation de la plante. Elle repose sur le pouvoir migratoire par diffusion des HE à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide.

Dans cette méthode, on utilise des disques de papier filtre de 9mm de diamètre (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Germany), imprégnés d'une certaine quantité d'HE (1 ou 2 gouttes par disque séparément, ce qui correspond à 20.5 mg à 41 mg/disque) que nous déposons à la surface d'un milieu gélosé (MH pour les bactéries et SAB pour les champignons) préalablement ensemencé en surface avec une suspension bactérienne (densité 0.5 McFarland). La boîte est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à température adéquate.

Chaque essence diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries et champignons croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'essence suffisante qui inhibe leur croissance.

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en mm. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible au produit à tester. Ainsi, la souche microbienne sera classée comme étant sensible, intermédiaire ou résistante aux HE.

Afin de mener une étude comparative du pouvoir antibactérien entre notre échantillon d'HE et des produits de références, nous avons utilisé des disques Antibiotiques (ATB) comme témoins positifs. Les ATB utilisés sont les suivants : Ampicilline (AMP, 10µg), Gentamicine (GN, 10µg), Céfotaxime (CTX, 30µg), Erythromycine (E, 15µg), Céfalotine (KF, 30µg), Oxacilline (OX, 5µg), Ticarcilline (TIC, 75µg) et Tobramycine (TM, 10µg).

#### **2.2.7.2. Microatmosphère ou méthode en phase vapeur :**

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

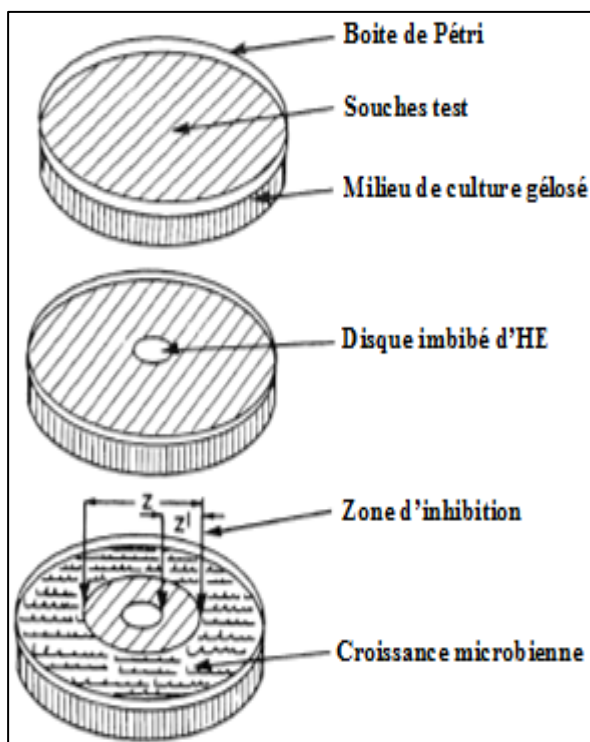
La différence entre cette méthode et les aromatochromes réside principalement dans la position du disque imprégné. Cette technique permet de mettre en évidence la diffusion des composants volatils des HE à l'intérieur d'une boîte de Pétri.

Le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé.

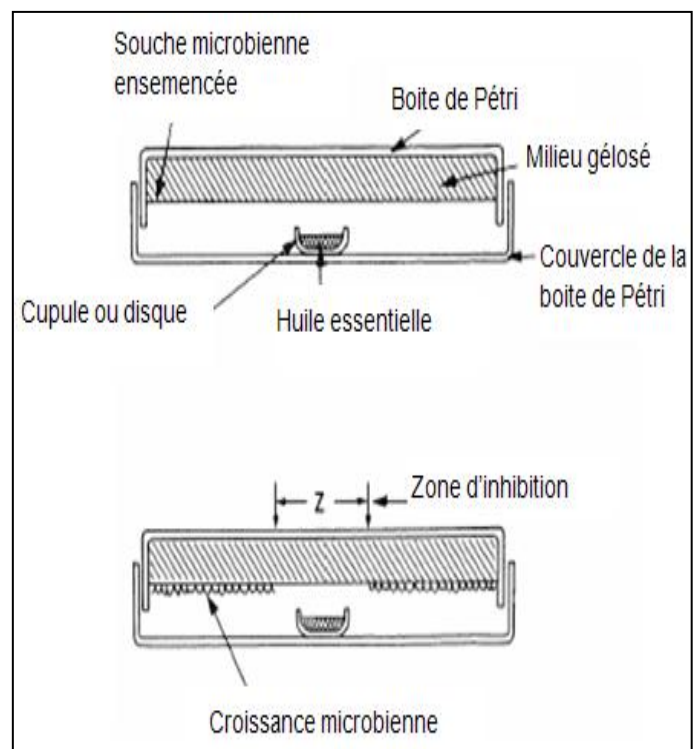
La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 72h ou 5 jours pour les levures et les moisissures, respectivement. Il se produit une évaporation des substances qui, en contact avec les microorganismes ensemencés sur la gélose, va inhiber leur croissance.

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire.

La boîte de contrôle, réalisée pour chaque expérience, est une boîte ensemencée dont le disque déposé au centre de la gélose n'est pas imbibé d'HE. Une autre boîte témoin est ensemencée dans les conditions de l'expérience, sans disque. Elle nous renseigne sur l'homogénéité du tapis bactérien.



**Figure 7:** Illustration de la méthode de l'aromatogramme. (Zaika, 1988)



**Figure 8:** Illustration de la méthode de microatmosphère. (Zaika, 1988)

#### a) Expression des résultats :

Dans la littérature relative aux HE, les résultats des aromatochromes et des microatmosphères sont exprimés à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions en mm. Cette mesure est souvent transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité (**Tableau 3**).

**Tableau 3:** Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés d'HE.

| <b>Diamètres de la zone d'inhibition</b> | <b>Transcription</b> | <b>Sensibilité</b> |
|--|----------------------|--------------------|
| 0  | 0                    | Résistant          |
| 0,5 cm                                   | ±                    | Peusensible        |
| 1 cm                                     | +                    | Sensible           |
| 2 à 3 cm                                 | ++                   | Assezsensible      |
| > 3 cm                                   | +++                  | Trèssensible       |

## **Résultats et Discussion**



### 3.1 Extraction et rendement en HE :

L'hydrodistillation de la partie aérienne sèche de la plante, menée dans un appareil Clevenger, a donné un rendement faible (0.22%) par rapport aux autres plantes à parfum. Cependant, ce taux est relativement élevé comparé à ceux rapportés dans la littérature. En effet, l'extraction que nous avons effectuée a été faite au mois de mai caractérisé par une photopériode optimale propice à la biosynthèse des HE.

De ce fait, nous étions dans l'obligation de procurer l'HE au près d'une société privé d'extraction des HE, située dans la région de Blida. Une quantité de 20 ml d'HE a été achetée au prix 400 DA. Cette HE est extrait à l'échelle industrielle par la méthode de l'entraînement à la vapeur d'eau. Cette quantité en HE nous a servie à effectuer les tests pharmaco-toxicologiques et microbiologiques.

### 3.2 Etude analytique de l'huile essentielle :

Les propriétés organoleptiques et physiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Nos essais sont déterminés selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'AFNOR

#### a) Caractéristiques organoleptiques :

Les paramètres organoleptiques et physiques de notre HE du Thym sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR (**Tableau 4**).

**Tableau4:** propriétés physiques et organoleptiques de l'HE du Thym

|                                     |                                |   |
|-------------------------------------|--------------------------------|---|
| Constantes<br>Physiques             | Densité à 20°C                 | 0.925   |
|                                     | Indice de réfraction à<br>20°C | 1.491   |
| Caractéristiques<br>organoleptiques | Aspect                         | Liquide mobile                                    |
|                                     | Couleur                        | Brun clair  |
|                                     | Odeur                          | Caractéristique, aromatique, légèrement<br>épicée |

La densité à 20°C de l'HE du Thym(0.925) est inférieure à celle de l'eau ce qui explique sa non miscibilité aux solutions hydrauliques.

L'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés d'oxygénés (**Koba, 2004**). Une forte teneur en monotrènes donnera un indice élevé ce qui est cas de l'HE de notre étude.

### Cinétique d'extraction de l'huile essentielle :

Dans le cas de la plante sèche du *Thymus vulgaris* L., le rendement en huile essentielle de l'extraction par hydrodistillation est de l'ordre de 0.22%. L'extraction s'effectue en deux étapes de durée inégale. L'étape de chauffage traduit l'augmentation de la température au sein du réacteur jusqu'à la température de distillation sensiblement égale à la température d'ébullition de l'eau. Cette période de chauffage est de l'ordre de 81 min. En revanche, l'étape d'extraction proprement dite durant laquelle les molécules aromatiques sont effectivement distillées est nettement plus longue (de l'ordre de 124 min pour l'HD). Les rendements en HE en fonction du temps sont représentés dans le (tableau5).

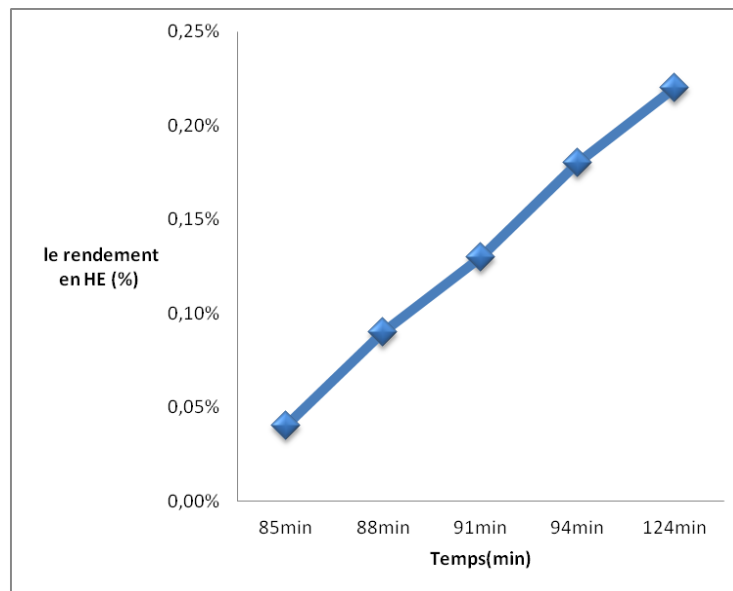
**Tableau 5:** Rendements de l'huile essentielle de Thym en durant la même extraction par HD.

|                          |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Durée d'extraction (min) | 81   | 85   | 88   | 91   | 94   | 124  |
| Rendement (%)            | 0.00 | 0.04 | 0.09 | 0.13 | 0.18 | 0.22 |

La durée d'extraction est théoriquement le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l'huile contenue dans la matière végétale. Or en pratique, il est difficile de récupérer toute l'huile. Ce temps correspond alors au moment pour lequel nous n'observons plus d'huile dans le distillat. Il détermine la fin du processus. Lors de cette étude, un suivi cinétique a été réalisé sur l'extraction de l'huile essentielle par HD (Figure 9)

Cette étude cinétique montre l'existence de trois étapes :

- Une première partie relative au chauffage de la matière végétale et correspondant à la montée en température au sein du réacteur, étape durant laquelle aucune extraction d'HE ne se produit.
- la seconde étape correspond à une extraction plus ou moins rapide de l'essence selon la technique d'extraction et la matrice traitée.
- Enfin, au cours de la 3<sup>ème</sup> étape, la courbe tend vers un second palier, qui correspond au rendement maximum possible d'être atteint dans les conditions expérimentales optimisées pour une matrice donnée.



**Figure9** : Cinétique d'extraction de l'HE du Thym par Hydrodistillation.

### Détermination du profil chromatographique de l'huile essentielle :

Notre étude a été axée sur les composés volatiles majoritaires de l'HE tandis que les molécules ayant des fragments de masse inférieure à 0.1% n'ont pas été reportées.

L'huile essentielle obtenue par la technique d'extraction HD a été analysée d'abord par chromatographie gazeuse avec un détecteur à flamme d'ionisation (GC-FID) sur une colonne capillaire apolaire HP5 MS. Pour une identification plus exhaustive des composés aromatiques, l'HE a été analysée, par la suite, par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) sur deux colonnes capillaires de polarités différentes HP MS qui est apolaire et Stabilwax, qui est polaire. Les conditions opératoires sont détaillées dans la partie expérimentale. Le Tableau 5 donne, dans l'ordre d'élution, les compositions qualitative et quantitative de l'HE extraite par HD selon les familles chimiques.

Ce sont au total 13 composés qui ont été décelés. Pour l'identification, nous avons d'abord calculé leurs indices de Kovats que nous avons comparés à ceux de la littérature. Nous avons, par la suite, procédé au dépouillement de leurs spectres de masse en se référant à ceux donnés dans les différentes bibliothèques.

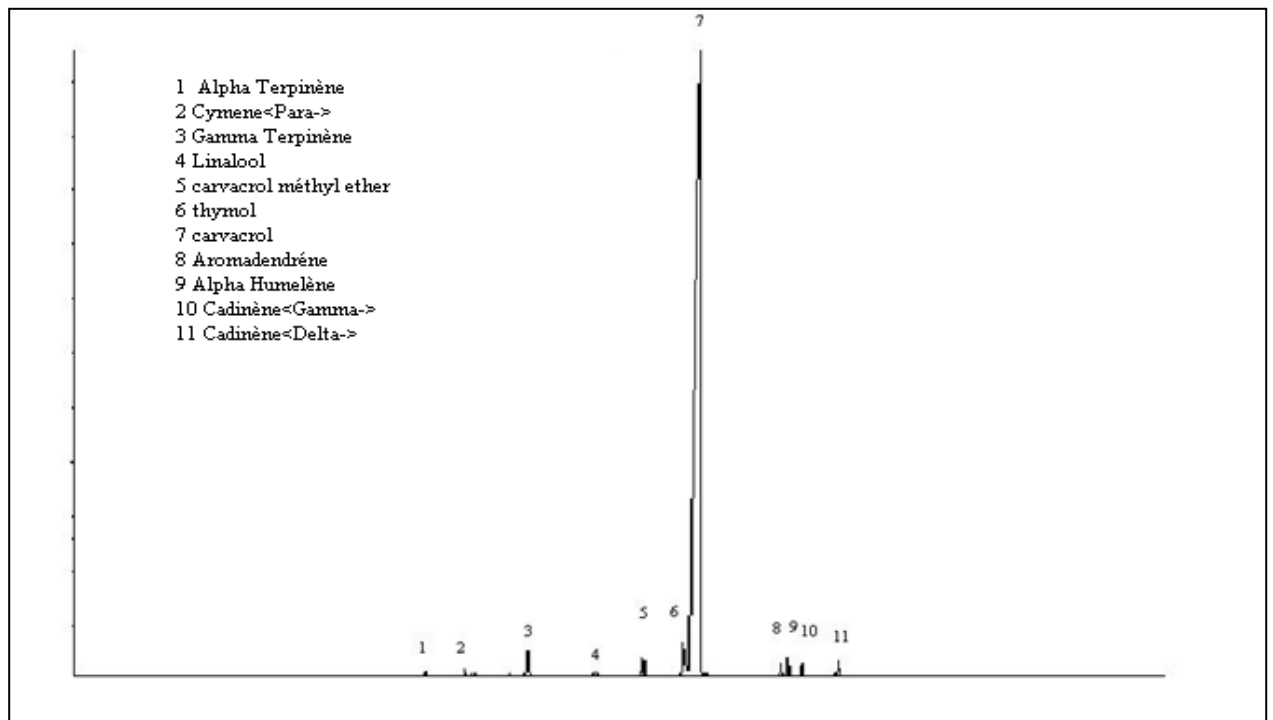
L'examen de ce tableau montre que le Thym étudié est composé majoritairement du carvacrol (83.8%). D'autre part, la teneur des autres composés varie entre (0.01 – 0.28%) sauf pour : le *para*-cymène (8.15%), linalool (1.44%) et le *gamma*-terpinène (4.96%).

La composition chimique, par famille, de l'huile essentielle du Thym nous révèle que :

- les monoterpènes sont présents en faibles teneurs ;
- l'huile est caractérisée par de très fortes teneurs en monoterpènes oxygénés ;

- l'huile extraite présente de très faibles teneurs en sesquiterpènes et une absence de sesquiterpènes oxygénés.

Les résultats de l'identification des composés sont regroupés dans le **tableau 6** et le chromatogramme de l'HE est représenté par la **figure 10**.



**Figure 10** : Chromatogramme de l'HE de *Thymus vulgaris* obtenue par HD.

**Tableau 6:** composition chimique de l'HE de *Thymus vulgaris* obtenue par HD

| N°                                  | Composés                | HD           | RI apolaire HP5MS |
|-------------------------------------|-------------------------|--------------|-------------------|
| <b>Monoterpènes</b>                 |                         | <b>13,5</b>  |                   |
| 1                                   | Alpha Terpinène         | 0,28         | 1019              |
| 2                                   | <i>para</i> -Cymène     | 8,15         | 1028              |
| 3                                   | <i>Trans</i> Ocimène    | 0,11         | 1052              |
| 4                                   | <i>gamma</i> -Terpinène | 4,96         | 1065              |
| <b>Monoterpènes Oxygénés</b>        |                         | <b>85,52</b> |                   |
| 5                                   | Linalool                | 1,44         | 1123              |
| 6                                   | Terpin-4-ol             | 0,05         | 1179              |
| 7                                   | Thymol                  | 0,23         | 1302              |
| 8                                   | Carvacrol               | 83,8         | 1318              |
| <b>Sesquiterpènes</b>               |                         | <b>0,13</b>  |                   |
| 9                                   | Aromadendrène           | 0,06         | 1439              |
| 10                                  | <i>Alpha</i> Humelène   | 0,03         | 1454              |
| 11                                  | <i>Gamma</i> -Cadinène  | 0,01         | 1513              |
| 12                                  | <i>delta</i> -Cadinène  | 0,03         | 1542              |
| <b>Autres composés oxygénés</b>     |                         | <b>0,19</b>  |                   |
| 13                                  | Carvacrol méthyl ether  | 0,19         | 1282              |
| <b>Composés Oxygénés totaux</b>     |                         | <b>85,71</b> |                   |
| <b>Composés non Oxygénés totaux</b> |                         | <b>13,63</b> |                   |

IR : Indice de rétention ; HD : Hydrodistillation

##### 5. Résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle :

L'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle du thym a été réalisée *in vitro* sur des souches microbiennes, de référence et isolées cliniquement. Au total, 15 bactéries ont été étudiées (5 Gram + et 10 Gram-) ainsi que 5 champignons (2 levures et 3 champignons filamenteux (moisissures)). Les résultats de ce screening antimicrobien sont rapportés dans le **Tableau 6**. A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

**Tableau 7:** Diamètre des zones d'inhibitions (mm) montrant l'activité antimicrobienne

| Les souches bactériennes           | Origine            | Méthode utilisée                                 |                 |                  |                 | Des souches<br>Les disques<br>d'ATB <sub>s</sub> |
|------------------------------------|--------------------|--|-----------------|------------------|-----------------|--|
|                                    |                    | Aromatogramme                                    |                 | Micro atmosphère |                 |  |
|                                    |                    | 1 gtte HE/disc                                   | 2 gttes HE/disc | 1 gtte HE/disc   | 2 gttes HE/disc |  |
|                                    |                    | Diamètre des zones d'inhibition (en millimètres) |                 |                  |                 |  |
| <i>Staphylococcus aureu (Sa1)</i>  | ATCC               | 60   | 65              | 53               | 66              |  |
| <i>S. aureus(Sa2)</i>              | Hémoculture        | 38   | 66              | 37               | 45              | TEC=18<br>OX=R<br>FOX=18                         |
| <i>S. aureus(Sa3)</i>              | ECBU               | 26   | 27              | 50               | 60              |  |
| <i>S. aureus(Sa4)</i>              | Pus                | 40   | 60              | 37               | 47              | TEC=20<br>VA=19<br>Cip=22                        |
| <i>Escherichia coli(E1)</i>        | ATCC               | 30   | 40              | 55               | 65              |  |
| <i>E. coli(E2)</i>                 | ECBU               | 32   | 46              | 50               | 60              |  |
| <i>E. coli(E3)</i>                 | Infection urinaire | 30   | 45              | 40               | 43              | KF=15<br>TIM=R<br>TIC=R                          |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>       | IU                 | 32   | 44              | 31               | 35              | TIC=14<br>AMP=R<br>Cip=40                        |
| <i>K. pneumoniae(BLSE)</i>         | IU                 | 25   | 51              | 11               | 26              | AMP=R<br>CIP=R<br>CTX=R                          |
| <i>Salmonella thyphi</i>           | Hémoculture        | 40   | 60              | 37               | 47              | AMP=30<br>CTX=30<br>NA=28                        |
| <i>Acenitobacter baumannii</i>     |                    | 10   | 16              | -                | -               |  |
| <i>Enterococcus sp.</i>            |                    | 30   | 35              | 22               | 36              | E=20<br>TE=R<br>DA=R                             |
| <i>Pseudomonas aerugenosa(pa1)</i> | ATCC               | 10   | 12              | -                | -               |  |
| <i>P. aeruginosa(pa2)</i>          | ECBU               | -  | -               | -                | -               | RA=18<br>IPM=13<br>GM=23                         |
| <i>Serratia sp.</i>                | Pus                | 26   | 27              | 50               | 60              |  |
| <b>Les souches fongiques</b>       |                    |  |                 |                  |                 |  |
| <i>Aspergillus flavus</i>          |                    | 10   | 12              | -                | -               |  |
| <i>Aspergillus terrus</i>          | Air                | 10   | 12              | -                | -               |  |
| <i>Penicillium sp.</i>             |                    | -  | -               | -                | -               |  |
| <i>Candida parapsilosis</i>        |                    | 60   | 70              | 60               | 65              |  |
| <i>Candida albicans</i>            | Pus de gorge       | 55   | 62              | 51               | 70              |  |

(-) aucune zone d'inhibition ; Le diamètre du disque (9 mm) a été incluse dans la mesure de la zone d'inhibition.

### Résultats del'aromatogramme :

En phase liquide, l'essence du thym a exhibé une activité bactérienne importante notamment sur les bactéries à Gram positive où les diamètres des zones d'inhibition varient entre 26 et 60mm pour les disques imprégnés d'une goutte d'HE et entre 27et 66mm pour le disque imprégné de deux gouttes d'HE par disque.

Les bactéries à Gram - ont présenté une certaine inhibition vis-à-vis de l'action antibactérienne de l'essence du thym, mais cette activité demeure inférieure comparativement aux Gram+. *Salmonella typhimurium* semble être l'espèce la plus sensible avec des DZI de 40mm à 60 mm pour une 1 et 2 gouttes d'HE par disque, respectivement. En revanche, *Pseudomonas aeruginosa* est le germe microbien le plus résistant car aucune inhibition n'a été constatée, et ce quel que soit la dose utilisée. Concernant les souches fongiques, les levures (*Candida albicans* et *C. parapsilosis*) sont les plus sensibles avec des DZI qui varient entre 55 et 60 mm.

En revanche, les champignons filamenteux n'ont pas été inhibés par l'action antifongique de l'essence car les DZI sont très faibles, inférieurs à 12 mm. Malheureusement, aucune étude comparative n'a été possible à cause de non disponibilité des disques antifongiques de référence.

Dans le même sillage, nous avons remarqué qu'il n'y a pas une différence de sensibilité entre les bactéries à Gram+ et à Gram-. Ceci est en contradiction avec la majorité des travaux antérieurs (**Nikaido et al, 1996 ; Tepe et al, 2005 ; Gilles et al, 2010**). Ces derniers confirment que les Gram+ sont plus sensibles à l'action antimicrobienne de l'HE que les Gram-. En fait, les Gram+ possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne.

Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques...). Par contre chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds...). La résistance des bactéries à Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules de franchir la membrane externe (**Cummins et Harris, 1956**).

En revanche, de rares publications rapportent qu'il n'existe aucun lien apparent, ni aucune corrélation entre l'activité anti microbienne de l'HE et la nature de la paroi bactérienne (**Zaika, 1988**).

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

Les souches du genre *Pseudomonas* se sont avérées plus résistantes à l'HE. Cette résistance n'est pas surprenante. Ceci a été confirmé par plusieurs études antérieures (**Hammer et al, 1999** **Dorman et Deans, 2000**).

#### **Résultats de la microatmosphère :**

En phase vapeur, l'HE du thym s'est avérée très efficace notamment sur les bactéries à Gram positive avec des DZI qui varient entre 37 à 66mm pour les deux doses utilisées. Les Gram négative ont été aussi inhibés mais à faible degré par rapport au Gram positive.

*Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les plus résistantes car aucune ZI n'a été détectée.

*E.coli* et *Serratia .sp* sont les deux espèces qui ont présenté la plus grande sensibilité avec des DZI supérieurs à 50mm.

A noter que cette action antibactérienne est « dose-dépendante » c'est-à-dire que plus la dose augmente plus le DZI est grand. Ceci a été vérifié pour les souches bactériennes.

En ce qui concerne les souches fongiques, c'est toujours les levures qui sont les plus sensibles à l'action antifongique de la phase gazeuse de l'essence du thym avec des DZI très grands, supérieurs à 51mm. Par contre est comme a été mentionné en l'aromatogramme, les champignons filamenteux semblent être très résistantes à la phase vapeur car aucune zone d'inhibition n'a été observé.

*In vivo*, l'incidence croissante des infections fongiques, plus particulièrement celles provoquées par les levures du genre *Candida* pousse à rechercher de nouveaux agents antifongiques qui ne soient pas fongostatiques, toxiques et générateurs de résistance comme ceux déjà utilisés. La recherche d'une alternative thérapeutique s'avère donc nécessaire. D'où l'intérêt d'essayer de transposer les résultats de l'action fongicide des HE obtenus *in vitro* sur des modèles *in vivo*.

L'activité antifongique des HE est le sujet de plusieurs études scientifiques *in vitro* depuis plusieurs années. Cependant, les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur.

Le mécanisme de l'action fongicide des HE a été abordé par quelques études qui sont arrivées à la conclusion que ce mécanisme se manifeste par une altération de la membrane plasmique de la cellule fongique. Cependant, les méthodes biochimiques utilisées dans ces travaux ne permettent pas de déceler d'autres altérations éventuelles notamment au niveau de la paroi cellulaire (**Cox et al, 2001**).

Pour ce qui de l'action antifongique de la phase vapeur des HE en générale, et celle de thym en particulier, très peu d'études ont été réalisées à ce jour (**Tyagi et Malik, 2011 ; Goni et al,**



**2009 ; Pibiri, 2006).** Notre travail reste à ce jour le premier du genre à cette en évidence l'activité antifongique de l'HE en micro-atmosphère.

#### **Etude comparative aromatoigramme et microatmosphère :**

A la lecture comparative entre les résultats obtenus par les deux méthodes, aromatoigramme et microatmosphère, il en ressort que la différence n'est pas importante en terme d'inhibition pour les souches bactériennes. Cependant quelques exceptions ont été signalées où la phase vapeur est plus active que la phase liquide. C'est le cas notamment de *Serratia sp.* dont les DZI (diamètres des zones d'inhibition) en microatmosphère (50et 60mm) semble être le double par rapport à l'aromatoigramme (26 et 27mm).

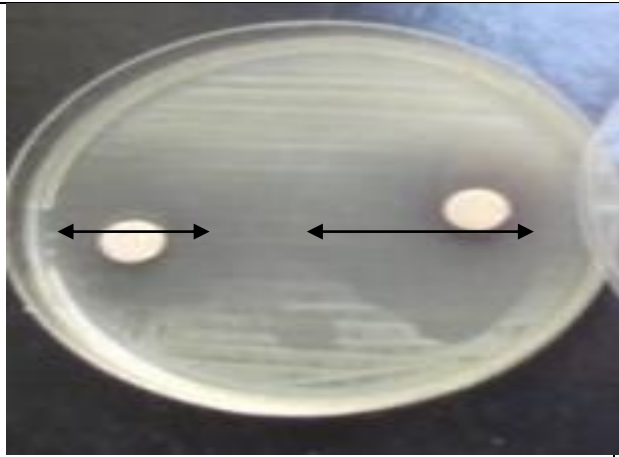
En revanche, pour d'autres germes microbiens, c'est la phase liquide qui présente une certaine efficacité par rapport à la vapeur, notamment pour la dose de deux gouttes par disque. C'est l'exemple de *Klebsiella pneumoniae* (BLSE) où les DZI notées sont de l'ordre de 25et 51mm en aromatoigramme de 11et 26mm en microatmosphère pour 1et 2 gouttes, respectivement.

Pour ce qui est des souches fongiques, les deux techniques semblent donner des résultats similaires; l'HE est fongicide sur les levures et sera sans effet notable sur les moisissures.

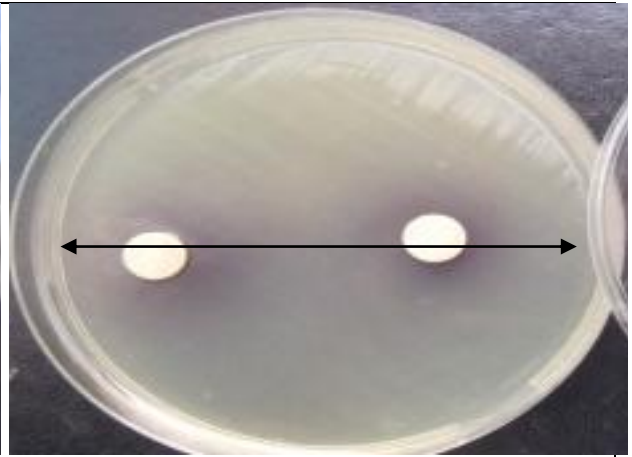
A la lecture de la littérature scientifique, il apparaît que la micro-atmosphère est très peu documenté. En effet, rares sont les articles qui traitent de cette méthode. Les études réalisées par **Tyagi et Malik (2010,2011)** ont mis en exergue que la phase vapeur est plus inhibitrice sur la croissance des germes que la phase liquide. Ceci a été confirmé notamment sur les Gram+ et les souches fongiques.

Par la même occasion, ces auteurs recommandent l'exploitation de cette propriété pour l'utilisation des HE. En phase liquide, l'HE est ajoutée à une grande concentration pour obtenir l'effet escompté (à savoir la bonne conservation de l'aliment) mais cela sera au détriment des propriétés organoleptiques des denrées alimentaires qui vont être modifiées voire altérées. Pour y remédier à ce problème, lesdits auteurs préconisent l'usage de l'HE en phase vapeur car une très faible quantité de celle-ci permettra d'avoir l'effet recherchée.

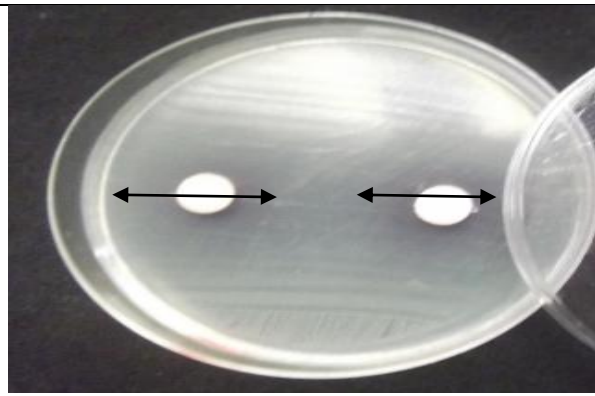
A titre d'exemple, ils recommandent l'incorporation des HE dans l'emballage et le packaging des aliments. Et puisque l'HE est volatile, donc elle va inhiber et éliminer toute contamination bactérienne et fongique sans le moindre contact avec l'aliment ce qui permet de conserver, au même temps, les propriétés organoleptique et sensorielle de l'aliment.



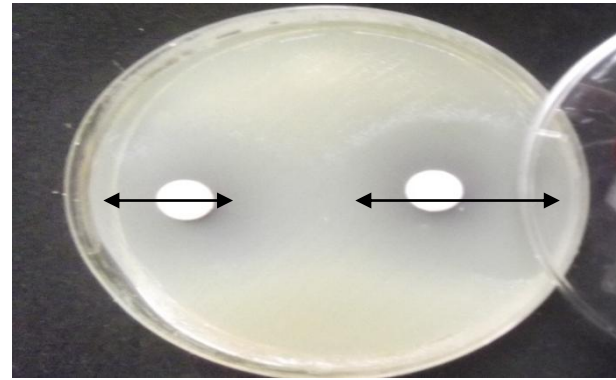
*Klebsiella pneumoniae*(BLSE)



*S. aureus*(pus)

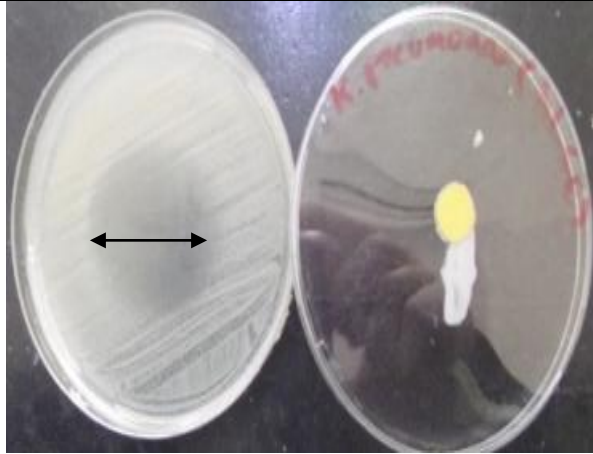


*E.coli*(IU)

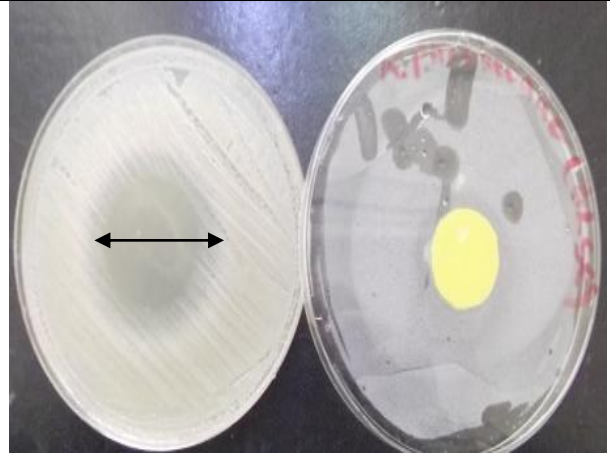


*E.coli* (ATCC)

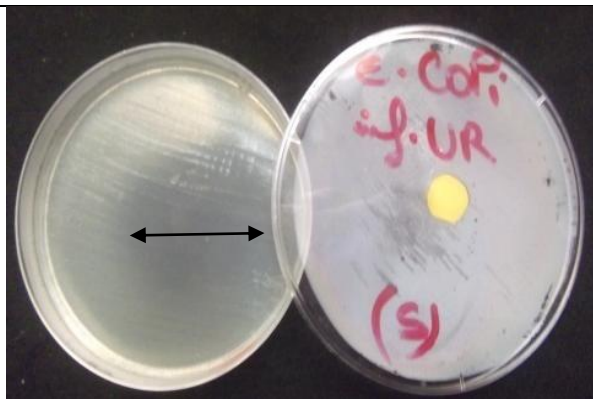
Figure 11: activité antibactérienne et antifongique de l'HE par l'aromatogramme (à gauche disque d'une goutte, à droite disque de deux gouttes).



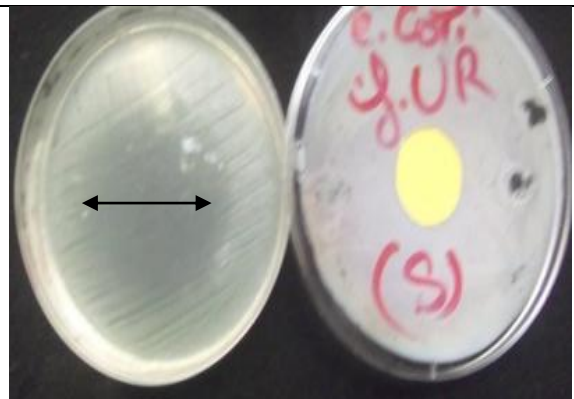
*Klebsiella pneumoniae*(BLSE) (1gtte HE)



*K. pneumoniae*(BLSE)(2gttes HE)



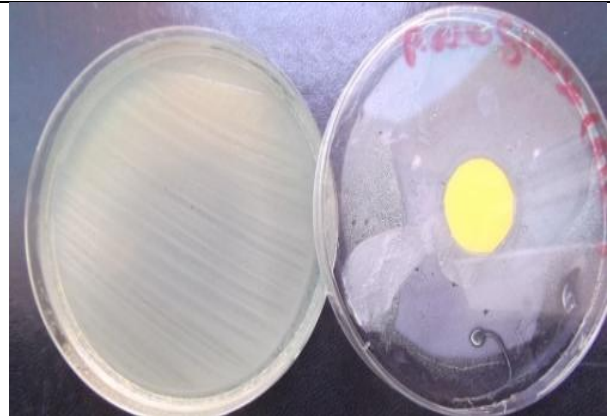
*E. coli* (IU) (1gtte HE)



*E. coli* (IU)(2gttes HE)

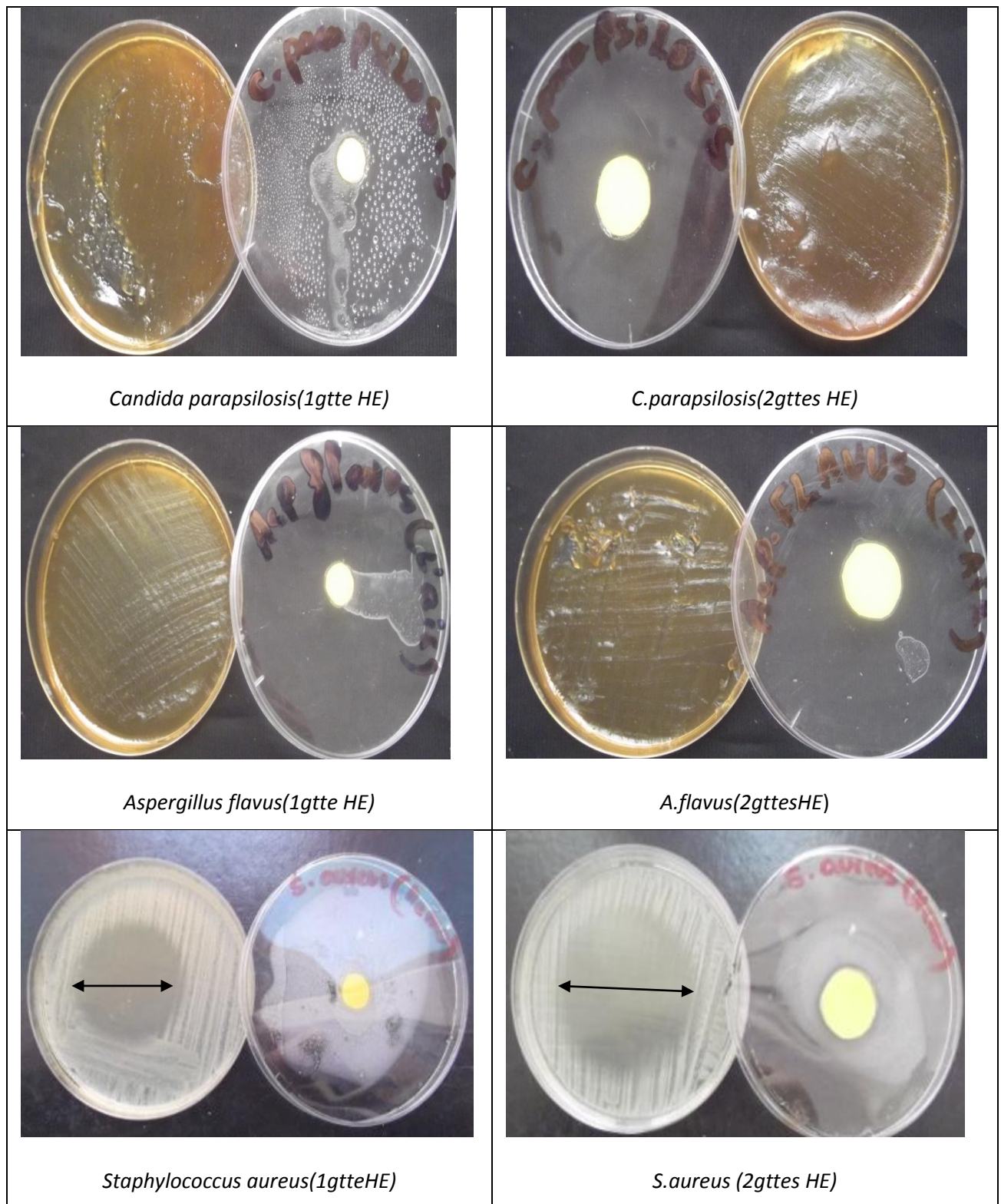


*P. aeruginosa*(ATCC) (1gtte HE)



*P. aeruginosa*(ATCC) (2gttes HE)





**Figure 12:**Activité antimicrobienne et antifongique de l'HE par la microatmosphère (à gauche disque d'une goutte, à droite disque de deux gouttes)

## Mécanisme d'action des huiles essentielles :

Les mécanismes d'action des HE et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés (**Hammeret al, 1999; Dorman et Deans, 2000; Bagamboulaet al, 2004**). Selon ces auteurs, cette sélectivité est le résultat de la composition variée des fractions actives des huiles, qui présentent souvent des actions synergiques. Il semble que le mécanisme d'action de ces huiles est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries à Gram+ et Gram-.

**Rayhour (2003)** a examiné le mécanisme d'action des HE des Clous de girofle et d'origan (*Origanum vulgare*) simultanément avec ceux de deux de leurs composants, le thymol et l'eugénol, sur des bactéries: *E. coli* et *Bacillus subtilis* et qui ont été utilisées respectivement comme modèles de bactérie Gram+ et Gram-. Les deux HE, tout comme leurs deux composants, ont été capables d'induire une lyse cellulaire. Cette action a été démontrée par la libération de substances absorbantes à 260 nm. Cette libération de substances associée à la rapide mortalité bactérienne pourrait être la conséquence de lésions sur les enveloppes induites par les agents antibactériens. L'utilisation d'un microscope électronique a permis de montrer que les HE attaquaient en même temps les membranes et les parois cellulaires.

Les travaux de **Burt (2004)** ont montré qu'une HE active exercera son pouvoir antimicrobien par son interférence avec la bicouche lipidique de la cellule cible grâce à sa propriété hydrophobe, ce qui entraîne une perturbation de la perméabilité et perte des constituants de la cellule. En plus, cette réaction varie en fonction de la nature de la bicouche lipidique, ce qui explique la résistance des bactéries Gram- (**Mahmoud et al, 2004**). En outre, **Dabbah** et ses collaborateurs (**1970**) ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram+ par rapport aux Gram- et aux champignons. Dans la même démarche d'étude, **Mahmoud et al (2004)** ont suggéré que l'effet antimicrobien qu'exercent les HE pourrait être expliqué par la destruction de certains systèmes enzymatiques incluant ceux qui participent dans la production d'énergie cellulaire et la production des composés structuraux. **Guesmi et Boudabous (2006)**, quant à eux, ont avancé l'hypothèse d'inactivation et destruction du matériel génétique et, enfin **Caillet** et ses collaborateurs (**2007**) ont signalé que les HE empêchent la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Dans une autre étude réalisée par **Carson et al (2006)**, l'HE d'arbre à thé (*Teatree*) a provoqué des fuites d'ions potassium (K<sup>+</sup>) au niveau des membranes cellulaires d'*E. coli* et *S. aureus*. Cette fuite de K<sup>+</sup> est la toute première preuve de l'existence de lésions irréversibles au niveau de la membrane

de la bactérie. Le thymol, le carvacrol, des composants actifs d'HE, rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de leur mort. Les HE ont donc bien des propriétés bactéricides.

D'après **Caillet et ses coll. (2007)**, l'action antimicrobienne des HE se déroule en 3 phases:

1- Attaque de la paroi bactérienne par l'HE, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;

2- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;

3- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

L'activité antibactérienne des HE ainsi que leur mode d'action sont directement influencés par la nature et la proportion de leurs constituants qui entrent dans leur composition. Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée (**Dormans et Deans, 2000 ; Kalemba et Kunicka, 2003**).

Selon **Bouaoun et al. (2007)**, la plupart des composés chimiques des HE sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes: carvacrol (origan, sarriette), eugénol (feuille de cannelle de Ceylan, clou de girofle), linalool (coriandre), cinnamaldéhyde (cannelle de Chine), thymol (thym) (**Cosentino, Tuberoso et al., 1999; Dorman et Deans, 2000**).

Les phénols sont, du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, décrits comme les composés les plus actifs. Aussi, il n'est pas étonnant de constater que les HE riches en phénols, comme les huiles de thym, d'origan et de clou de girofle, démontrent les plus hautes activités antibactériennes. **Gideon et al. (2007)** ont rapporté que les phénols sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane et des parois cellulaires des bactéries.

**Stylo et al. (2005)** ont montré que la nature antimicrobienne des HE est en rapport avec leur fort contenu phénolique en particulier en thymol et carvacrol. Ils ont prouvé que plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les HE sont efficaces.

**Pinto et al (2006)** ont rapporté que les espèces du genre *Thymus*, qui contiennent une quantité importante en phénols, présentent un large spectre d'activité sur les champignons filamenteux.

Le **thymol** et l'**eugénol** sont responsables de l'activité fongicide (**Bennis, Chami et al., 2004**) et bactéricide des HE qui en contiennent (**Cox, Mann et al., 2000; Lambert, Skandamis et al., 2001; Walsh, Maillard et al., 2003**). La molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium K<sup>+</sup>. En revanche elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa* (**Walsh, Maillard et al., 2003**).

Les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques dans des préparations pharmaceutiques. Les phénols sont à l'aromathérapie ce que sont les antibiotiques à la médecine de synthèse. Ils sont utilisés aussi bien *per os* qu'en application locale et l'apport supplémentaire d'une faible activité antioxydante et de propriétés anti-inflammatoires reconnues en font des outils thérapeutiques majeurs.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Haddaf et al. (2004)**. Ces derniers ont étudié l'activité antifongique de 2 espèces de Thym. Ils ont rapporté une activité antifongique plus élevée pour l'HE de *Thymus vulgaris* bien que sa teneur en phénols (thymol et carvacrol) (36.7%) soit inférieure à celle de *Thymus numidicus* (65.87%). Ils ont conclu que d'autres constituants pourraient intervenir dans le pouvoir antifongique de l'HE.

- Le carvacrol possède aussi un large spectre d'activité, étendu à l'adultération des aliments ou des champignons pathogènes, des levures et des microorganismes pathogènes humains, animaux et végétaux, des biofilms bactériens y compris lors de résistance aux antibiotiques. Cette activité a été attribuée à ses effets considérables sur les propriétés structurales et fonctionnelles de la membrane cytoplasmique (**Iannitelli et al., 2011 ; Nostro et Papalia, 2011**). Les cibles préférées du carvacrol sont *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*.

Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes a été décrit dans la littérature. Le carvacrol et le thymol semblent capables d'augmenter la perméabilité membranaire (**Lambert et al., 2001**). En détruisant la membrane externe des bactéries Gram négatives, ils augmenteraient la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (**Helander et al., 1998**). Ce composé pénètre dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité passive. Chez les bactéries exposées au carvacrol, on observe une diminution de l'ATP intracellulaire, mais aussi une diminution du potentiel membranaire.

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

**Didry 1994** a montré l'effet antimicrobien du thymol et du carvacrol, utilisé individuellement ou en combinaison sur des germes d'infection respiratoire.



Une association thymol (62.5 mg/kg) – carvacrol (75 mg/kg) inactive *Listeria innocua*. L'ajout d'eugénol augmente encore l'activité du mélange (**Garcia-Garcia et al., 2011.**) alors qu'un mélange eugénol, cinnamaldehyde, thymol, carvacrol, inactive *Escherichia coli* (**Pei et al., 2009**). Thymol et carvacrol réduisent la résistance de *Salmonella typhimurium* à l'ampicilline, la tétracycline, la pénicilline, la bacitracine, l'érythromycine et la novobiocine et la résistance de *Streptococcus pyogenes* à l'érythromycine (réduction des doses minimales d'inhibition) (**Palaniappan et Holley, 2010**).

Les composés oxygénés purs ont aussi montré une activité supérieure par rapport aux HE dans lesquelles ils se trouvent. **Pinto et al. (2006)** ont testé séparément l'activité de carvacrol, *p*-cymène et terpinène (qui sont des constituants de l'HE de *Thymus pulegioides*) sur *Candida* et *Aspergillus* et autres dermatophytes. Les résultats obtenus montrent une activité antifongique plus importante du carvacrol sur les 2 espèces par rapport à l'action de l'HE prise dans son ensemble.

## Conclusion

Les huiles essentielles(HE) et les aromes extraits à partir des herbes aromatiques et des épices sont le résultat d'un mélange complexe de substances volatiles. Ils sont généralement présents à de très faibles concentrations dans les plantes à parfum. Avant de pouvoir utiliser ou analyser de telles substances, il est nécessaire de les extraire de leur matrice.

Dans ce travail, nous avons extrait l'essence aromatique d'une plante à parfum, le Thym, en vue de la tester *in vitro* pour apprécier son activité antimicrobienne en phase liquide et vapeur.

L'analyse semi-quantitative de l'huile essentielle par GC-FID et GC-SM nous a permis d'identifier et de quantifier 13 composés. Le Thym étudié est composé majoritairement du carvacrol (83%). D'autre part, la teneur des autres composés est inférieure à 1% sauf pour le para-cymène (8,15%), linalool (1,44%), et gamma-terpène (4,96%). L'essence peut être classée en chémotype « carvacrol ».

L'efficacité antimicrobienne de l'essence du Thym a été étudiée sur plusieurs souches bactérienne et fongique, de référence ou isolées cliniquement.

En phase liquide, l'HE est très actif sur les bactéries à Gram+ et les levures du genre *Candida* et sera en revanche moins efficace sur les bactéries à Gram- et les champignons filamenteux.

En phase vapeur, des résultats similaires ont été obtenus ce qui présage de l'utilité de cette huile comme désinfectant de l'air ou des systèmes de climatisation, notamment en milieu hospitalier afin de lutter contre les infections nosocomiales.

L'HE du Thym s'est avérée un bactériostatique majeure et cette activité biocide semble être en relation avec la présence d'un composé phénolique majoritaire, en l'occurrence le carvacrol. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est-à-dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires.

L'autre conclusion à souligner consiste à dire que la fragrance du Thym a présenté de meilleurs résultats comparativement aux ATB utilisés comme référence. L'usage de la fraction aromatique du Thym en aromathérapie anti-infectieuse ou pour la prévention contre les infections dues aux germes multi résistants nous paraît pleinement justifiée.

Comme perspective, il serait intéressant d'élargir la gamme des souches microbiennes en ciblant d'autres sérovars ou variété, notamment impliqués dans les infections nosocomiales ou encore dans les toxi-infections alimentaires.

Il serait utile de tester cette essence avec d'autres méthodes quantitative et surtout qualitative. La détermination des CMI est très utile pour une éventuelle utilisation en application clinique.

## Références Bibliographiques

1. Abe, S., Sato, Y., Inoue, S., Ishibashi, H., Maruyama, N., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2002). Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. *Japanese journal of medical mycology*, 44(4), 285-291.
2. Abou Samra, C. (2003). Activité antiseptique d'huiles essentielles: exploitation de l'aromatogramme. *La phytothérapie européenne*, (16), 18-22.
3. Aburjai, T., & Natsheh, F. M. (2003). Plants used in cosmetics. *Phytotherapy research*, 17(9), 987-1000.
4. Adorjan, B., & Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407-426.
5. AFNOR. « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR, Paris, 2000, 661-663.
6. Ahn, Y. J., Park, S. J., Choi, D. H., Cho, H. C., & Hiremath, I. G. (1998). Growth-inhibitory responses of human intestinal bacteria to extracts from Indian and African plants. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 41.
7. Aiache, J. M., Carnat, A. P., Coudert, P., & Teulade, J. C. (2011). *Sources actuelles et futures du médicament, Chimie du médicament: Conforme au programme PAES*. Masson.
8. AitMbarek, L., Ait Mouse, H., Elabbadi, N., Bensalah, M., Gamouh, A., Aboufatima, R., ... & Zyad, A. (2007). Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(6), 839-847.
9. Akhila, A. (Ed.). (2010). *Essential oil-bearing grasses: the genus Cymbopogon*. CRC Press.
10. Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168-4170.
11. Ali-Shtayeh, M. S., & Abu Ghdeib, S. I. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, 42(11-12), 665-672.
12. AQUINO R. « Arômes méditerranéens pour la réalisation des lignes cosmétiques méditerranéenne ». *Journal of Cosmetic Sciences* 53 (Nov-déc.), 321-335, 2002.
13. Arias, B. A., & Ramón-Laca, L. (2005). Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(1), 89-95.
14. Atkins, P. W. (1998). *Chimie: molécules, matière, métamorphoses*. De Boeck Supérieur.
15. Baba Aïssa F. (2011). *Encyclopédie des plantes utiles : Plantes médicinales, Plantes aromatiques, Plantes alimentaire. Flore d'Algérie. (Méditerranéenne, maghrébine et sahariennes)*. Editions el Maarifa, 471p.
16. Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2010). Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(3), 327-336.
17. Barbosa, L. C. A., Pereira, U. A., Martinazzo, A. P., Maltha, C. R. Á., Teixeira, R. R., & Melo, E. D. C. (2008). Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf samples. *Molecules*, 13(8), 1864-1874.
18. Bard, M., Albrecht, M. R., Gupta, N., Guynn, C. J., & Stillwell, W. (1988). Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids*, 23(6), 534-538
19. Bardeau, F. (2009). *Les huiles essentielles: Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale*. Fernand Lanore.
20. Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (Eds.). (2010). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press.

21. Basli, A., Chibane, M., Madani, K., & Oukil, N. (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10(1), 2-9.
22. BAUDOUX D. « L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles ». *Douce Alternative*, 2000 ; Biarritz (France), pp : 6-29, 221.
23. Bautista-Baños, S., Ramos-García, M. D. L., Hernández-López, M., Córdova-Albores, L., López-Mora, L. I., Gutiérrez-Martínez, P., & Sánchez-Domínguez, D. (2012). Use of scanning and transmission electron microscopy to identify morphological and cellular damage on phytopathogenic fungi due to natural products application.
24. Beckmann, H., & Le Quesne, S. E. (2005). *The Essential Guide to Holistic and Complementary Therapy*. Cengage Learning EMEA.
25. Belaiche, P. (1979). *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*.
26. Benjlali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ayadi, A., & Ihlal, M. (1984). Method to study antimicrobial effects of essential oils: application to the antifungal activity of six Moroccan essences. *Journal of Food protection*, 47(10), 748-752.
27. Benjlali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ismaili-Alaoui, M., & Ayadi, A. (1986). Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 20(2), 155-67.
28. Beylier-Maurel, M. F. (1976). Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana. EPPOS*, 58, 283-286.
29. Blackwell, R., & Smith, M. (1995). Aromatograms. *International Journal of Aromatherapy*, 7(1), 22-27.
30. BLANC, Michel. *Decontaminating and detoxifying method for domestic sanitation*. European Patent No EP 0625913, 22 juill. 1998.
31. Blanco, M. M., Costa, C. A. R. A., Freire, A. O., Santos Jr, J. G., & Costa, M. (2009). Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine*, 16(2), 265-270.
32. Bodiou, L., Frère, D., & Mehl, V. (2008). *Parfums et odeurs dans l'antiquité*. Presses universitaires de Rennes.
33. BOLIS, A. (2011). Le boom des bactéries résistantes aux antibiotiques. *Le Monde*, 30.
34. Boorn, K. L., Khor, Y. Y., Sweetman, E., Tan, F., Heard, T. A., & Hammer, K. A. (2010). Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1534-1543.
35. Bouhdid, S., Abrini, J., Baudoux, D., Manresa, A., & Zhiri, A. (2012). Les huiles essentielles de l'origan compact et de la cannelle de Ceylan: pouvoir antibactérien et mécanisme d'action. *Journal de Pharmacie Clinique*, 31(3), 141-148.
36. Boullard, B. (2001). *Plantes médicinales du monde: croyances et réalités*. De Boeck Secundair.
37. Breuil, J., Casin, I., Hanau-Bercot, B., Dublanquet, A., & Collatz, E. (2001). Troisième enquête nationale sur la sensibilité aux antibiotiques des salmonelles et shigelles: résultats de l'étude 2000 du collège de bactériologie, virologie et hygiène des hôpitaux. *Bull Epidémiol Hebdom*, 43, 203-5.
38. Bruneton J. « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ». Editions Tec & Doc, Paris 1999, éditions médicales internationales, pp: 483-560.
39. Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*, 4 e éd. Tec & Doc/Lavoisier, Paris, 841-842.

40. Buchbauer, G., Jirovetz, L., Jager, W., Dietrich, H., Plank, C., Singh, S. P., ... & Maki-Hokkonen, H. (1991). Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z Naturforsch C*, 30, 395-396.
41. Burlando, B., Verotta, L., Cornara, L., & Bottini-Massa, E. (2010). *Herbal Principles in Cosmetics: Properties and Mechanisms of Action*. CRC Press.
42. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
43. Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., & Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2), 215-220.
44. Carmo, E. S., Lima, E. D. O., & Souza, E. L. D. (2008). The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 362-367.
45. Carson, C. F., & Hammer, K. A. (2011). Chemistry and bioactivity of essential oils. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, 203-238.
46. Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V. (1994). Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*, 82(332), 181-185.
47. Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
48. Cavalcanti, E. S. B., Morais, S. M. D., Lima, M. A. A., & Santana, E. W. P. (2004). Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5), 541-544.
49. Celimene, C. C., Micales, J. A., Ferge, L., & Young, R. A. (1999). Efficacy of pinosylvins against white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung*, 53(5), 491-497.
50. Chalchat, J. C., Garry, R. P., Menut, C., Lamaty, G., Malhuret, R., & Chopineau, J. (1997). Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 9(1), 67-75.
51. Chami, F. (2005). Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo: Application dans la prophylaxie et le traitement de la candidose vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés.
52. Chaumont, J. P., & Millet-Clerc, J. (2011). *Phyto-aromathérapie appliquée à la dermatologie*. <http://www.lavoisier.fr/>.
53. Chebaibi, A., Filali, F. R., Amine, A., & Zerhouni, M. (2011). Effet bactéricide (in vitro) des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum* L.) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 9(3), 158-164.
54. Chemat, F., Abert-Vian, M., & Fernandez, X. (2013). Microwave-assisted extraction of essential oils and aromas. In *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds* (pp. 53-68). Springer US.
55. Chemouny, B. (2012). *Soigner le stress par l'homéopathie et la phytothérapie*. Odile Jacob.
56. Chen, S. S., & Spiro, M. (1994). Study of microwave extraction of essential oil constituents from plant materials. *Journal of microwave power and electromagnetic energy*, 29(4), 231-241.

57. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
58. Cox, S. D., Gustafson, J. E., Mann, C. M., Markham, J. L., Liew, Y. C., Hartland, R. P., Wyllie, S. G. (1998). Tea tree oil causes K<sup>+</sup> leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 26(5), 355-358.
59. Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170-175.
60. Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2001). Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. *Molecules*, 6(2), 87-91.
61. De Billerbeck, G. (2000). Activité fongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur *Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur. Thèse de Doctorat, Faculté des sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse, Toulouse, France.
62. De Billerbeck, V. G. (2002). Essais d'utilisation d'huiles essentielles en traitement de l'air. Les contaminants biologiques des biens culturels, 2, 345.
63. De Billerbeck, V. G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5(5), 249-253.
64. De Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L., & Dargent, R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(1), 9-17.
65. De Billerbeck, V. G., Roques, C., Vanière, P., & Marquier, P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*, 10(3), 248-251.
66. de Sousa, D. P. (2012). *Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects*. Nova Science Publishers.
67. Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1), 101-109.
68. Delespaul, Q., de Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Michel, G., Marquier-Viñuales, C., & Bessière, J. M. (2000). The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 256-266.
69. Derbré, S. (2009). Emploi de la phytothérapie et de l'aromathérapie en prévention et traitement des dermatomycoses. *Actualités Pharmaceutiques*, 48(484), 19-20.
70. Derwich, E., Benziane, Z., & Boukir, A. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 3818-3824.
71. Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 107-115.
72. DEYSSON G. « Organisation et classification des plantes vasculaires ». Ed. SEDES et CDVI, Paris 1978, Tome II, 381 p.
73. Didry, N., Dubreuil, L., & Pinkas, M. (1994). Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 69(1), 25-28.
74. Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
75. Dridi, F. (2005). Extraction et analyse de l'huile essentielle de cumin formulation d'une pommade décongestionnante.

76. Dris, R., & Jain, S. M. (Eds.). (2004). *Production practices and quality assessment of food crops: volume 3: quality handling and evaluation* (Vol. 3). Springer.
77. Druilles, J., Chantefort, A., & Huet, M. (1995). La désinfection chimique de l'air: mythe ou réalité?. *Médecine et maladies infectieuses*, 15(8), 421-429.
78. Druilles, J., Chantefort, A., & Huet, M. (1995). La désinfection chimique de l'air: mythe ou réalité?. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 15(8), 421-429.
79. Duraffourd, C., & Lapraz, J. C. (2002). *Traité de phytothérapie clinique: endobiogénie et médecine*. Elsevier Masson.
80. Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308-323.
81. Edwards-Jones, V., Buck, R., Shawcross, S. G., Dawson, M. M., & Dunn, K. (2004). The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. *Burns*, 30(8), 772-777.
82. El-Kamali, H. H., Ahmed, A. H., Mohammed, A. S., Yahia, A. A. M., El-Tayeb, I. H., & Ali, A. A. (1998). Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts. *Fitoterapia*, 69(1), 77-78.
83. Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64(08), 711-713.
84. Fandohan, P., Gnonlonfin, B., Laleye, A., Gbenou, J. D., Darboux, R., & Moudachirou, M. (2008). Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2493-2497.
85. Ferhat, A. (2010). *Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application* (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).
86. Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., Smadja, J., & Chemat, F. (2006). An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A*, 1112(1), 121-126.
87. Festy, D. (2008). *100 réflexes aromathérapie: Je me soigne avec les huiles essentielles. + pratiques, + efficaces, + faciles. Nouvelle édition enrichie*. Leduc. s Éditions.
88. Festy, D. (2009). *Les huiles essentielles, ça marche!: Tous les bons gestes pour se soigner autrement*. Leduc. s Éditions.
89. Festy, D. (2012). *Je ne sais pas utiliser les huiles essentielles: Découvrir l'aromathérapie: LE guide pour se soigner facilement et sans risque*. Leduc. s Éditions.
90. Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213-226.
91. Fiori, A. C. G., Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Vida, J. B., Scapim, C. A., Cruz, M. E. S., & Pascholati, S. F. (2000). Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *Journal of Phytopathology*, 148(7-8), 483-487.
92. Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in food science & technology*, 19(3), 156-164.
93. Fleurette, J., Freney, J., & Reverdy, M. E. (1995). *Antisepsie et désinfection*, éditions ESKA.
94. Franchomme, P., Jollois, R., & Pénéol, D. (1990). *L'Aromathérapie exactement: encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles: fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle*. Roger Jollois Editeur.
95. Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102(3), 898-904.

96. Garnéro J. « Huiles essentielles ». K 345. Techniques de l'Ingénieur, traité Constantes physico-chimiques, vol. K3 (1996).
97. Garreta, R. (2007). Des simples à l'essentiel: de l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales. Presses Univ. du Mirail.
98. Gilles, M., Zhao, J., An, M., & Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry*, 119(2), 731-737.
99. Gilly, G. (1997). Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse: botanique, culture, chimie, production et marché. Editions L'Harmattan.
100. Giménez-Arnau, A. (2010). Les biocides: anges ou démons? De l'activité anti-microbienne aux effets indésirables. *Progrès en dermatoallergologie*. Cours du GERDA 2010John LibbeyEurotext, Strasbourg, 101-122.
101. Giordani, R., & Kaloustian, J. (2006). Action anticandidosique des huiles essentielles: leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Phytothérapie*, 4(3), 121-124.
102. Girardo, P., Reverdy, M. E., Martra, A., & Fleurette, J. (1989). Détermination de la concentration minimale bactéricide de trois antiseptiques et un désinfectant sur 580 souches de bacilles à Gram négatif d'origine hospitalière. *Pathologie Biologique*, 37, 605-11.
103. Giraud-Robert, A. M. (2005). Intérêt de l'aromathérapie dans la prise en charge des hépatites virales\*. *Phytothérapie*, 3(6), 235-247.
104. Goeb P. (1995). La diffusion atmosphérique d'huiles essentielles : bien-être olfactif, purification de l'air et bienfaits thérapeutiques. *Infections Dent*. 41, 3371-3374.
105. Goetz, P. (2007). Aromathérapie en pathologie digestive. *Phytothérapie*, 5(1), 21-24.
106. Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). Introduction à la phytothérapie anti-infectieuse. In *Phytothérapie anti-infectieuse* (pp. 3-14). Springer Paris.
107. Golmakani, M. T., & Rezaei, K. (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*, 109(4), 925-930.
108. Goni, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982-989.
109. Grare, M., Fontanay, S., Cornil, C., Finance, C., & Duval, R. E. (2008). Tetrazolium salts for MIC determination in microplates: Why? Which salt to select? How?. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 156-159.
110. Griffin, S. G., Markham, J. L., & Leach, D. N. (2000). An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 249-255.
111. Grosjean N. (2007). L'aromathérapie tout simplement. Editions eyrolles, Belgique. pp 53, 54,55.
112. Grosjean, N. (2011). Les huiles essentielles: Se soigner par l'aromathérapie. Editions Eyrolles.
113. Guedj, R. (1983). Contribution à l'étude de l'aromathérapie anti-infectieuse: l'aromatogramme et les préparations officinales aromatiques (Doctoral dissertation).
114. Guinoiseau, E. (2010a). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action (Doctoral dissertation, Université de Corse).
115. Guinoiseau, E., Luciani, A., Rossi, P. G., Quilichini, Y., Ternengo, S., Bradesi, P., & Berti, L. (2010b). Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29(7), 873-879.



116. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26(2), 142-150.
117. Hallahan, D. D. L., Callow, J. A., & Gray, J. C. (Eds.). (2000). *Plant trichomes*(Vol. 31). Access Online via Elsevier.
118. Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1998). *In-vitro* activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(5), 591-595.
119. Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.
120. HERVE, M. (1997). Conservation des aliments: Des alternatives aux additifs?.*Process*, (1124), 72-74.
121. Hili, P., Evans, C. S., & Veness, R. G. (1997). Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*, 24(4), 269-275.
122. Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273-292.
123. Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.
124. Hubert, *Epices et aromates*, Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris, 1992.
125. Hulin, V., Mathot, A. G., Mafart, P., & Dufossé, L. (1998). Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, 18(6), 563-582.
126. Huntley, A. L. (2000). Medical Aromatherapy. Healing with Essential Oils. Focus on Alternative and Complementary Therapies, 5(3), 236-236.
127. Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1827-1836.
128. Ibrahim, D. (1992). Antimicrobial activity of the essential oil of the local serai, *Cymbopogon citratus*. *Journal of Bioscience*, 3(1-2), 87-90.
129. Il Idrissi, A., Bellakhdar, J., Canigual, S., Iglesias, J., & Vila, R. (1993). Composition de l'huile essentielle de la citronnelle (*Cymbopogon citratus* (DC.) STAPF) acclimatée au Maroc. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 26(4), 274-277.
130. Inouye, S. (2003). Laboratory evaluation of gaseous essential oils (part 1). *International Journal of Aromatherapy*, 13(2), 95-107.
131. Inouye, S., & Abe, S. (2007). Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*, 5(1), 2-4.
132. Inouye, S., Abe, S., Yamaguchi, H., & Asakura, M. (2003). Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. *International Journal of Aromatherapy*, 13(1), 33-41.
133. Inouye, S., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 47(5), 565-573.
134. Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P., Moulard, F., de La Roque, R., de La Roque, O., & Botrel, A. *Encyclopédie des Plantes Médicinales*, 2ème édition, 2001.
135. Jafri, M. A., Javed, K., & Singh, S. (2001). Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb). *Journal of ethnopharmacology*, 75(2), 89-94.
136. Janardhanan, M. (2004). *Herb and spice essential oils*. Discovery Publishing House.

137. Jans, B., Glupczynski, Y., & Denis, O. (2011). Surveillance des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les hôpitaux belges. *Rapport annuel*.
138. Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C., & Svendsen, A. B. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica*, 53(05), 395-398.
139. Joarder, G. J., & Khatun, M. (1982). Inhibitory effects of lemon grass oil on indigenous microflora. Part 1-Inhibition of *Aspergillus niger*. *Bangladesh Journal of Science and Industry Research*, 17, 219-226.
140. Joseph, B., & Priya, R. M. (2010). In vitro antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf essential oil and extracts using agar well diffusion method.
141. Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.
142. Kanko, C., Sawaliho, B. E. H., Kone, S., Koukoua, G., & N'Guessan, Y. T. (2004). Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10), 1039-1042.
143. Karioti, A., Vrahimi-Hadjilouca, T., Droushiotis, D., Rancic, A., Hadjipavlou-Litina, D., & Skaltsa, H. (2006). Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Plantamedica*, 72(14), 1330-1334.
144. Khandelwal, K. (2008). *Practical pharmacognosy*. Pragati Books.
145. Khanuja, S. P., Shasany, A. K., Pawar, A., Lal, R. K., Darokar, M. P., Naqvi, A. A., & Kumar, S. (2005). Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon Spreng.*(Poaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(2), 171-186.
146. Khebri, S., Chelgham, I., Dridi, S., & Athamena, S. (2012). L'activité antifongique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 22(1), 116.
147. Kim, J., Marshall, M. R., & Wei, C. I. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2839-2845.
148. Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., & Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1(3), 119-128.
149. Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y., Millet J., Chaumont J.P. (2004). Activité antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. Vis-à-vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148, 202-206.
150. Koba, K., Sanda, K., Guyon, C., Raynaud, C., Chaumont, J. P., & Nicod, L. (2008). In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 4(1), 29-34.
151. Koh, H. L. (2009). *A Guide to Medicinal Plants: An Illustrated Scientific and Medicinal Approach*. World Scientific.
152. Kurita, N., & Koike, S. (1982). Synergistic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oil components. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(1), 159-165.
153. Lacoste, S. (2012). *Ma bible des trucs de santé: La bible de tous les trucs qui marchent pour se soigner!*. Leduc. s Éditions.
154. Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy research*, 18(6), 435-448.

155. Laird, K., & Phillips, C. (2012). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. *Letters in Applied Microbiology*, 54(3), 169-174.
156. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
157. Lamendin, H. (2008). *Précurseurs de la phytothérapie bucco-dentaire occidentale*. l'Harmattan.
158. Lamendin, H., Toscano, G., & Requirand, P. (2004). Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires. *EMC-Dentisterie*, 1(2), 179-192.
159. Lang, G., & Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1), 13-39.
160. Lardry, J. M., & Haberkorn, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la revue*, 7(61), 14-17.
161. Lawrence, B. M. (2005). *Antimicrobial/biological activity of essential oils*. Allured Publishing Corporation.
162. Le Minor, L., & Véron, M. (Eds.). (1982). *Bactériologie médicale*. Flammarion médecine-sciences.
163. Lee, Y. S., Kim, J., Shin, S. C., Lee, S. G., & Park, I. K. (2008). Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(1), 23-28.
164. Leszczynska, D. (2007). Management de l'innovation dans l'industrie aromatique: Cas des PME de la région de Grasse. l'Harmattan.
165. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. J. Wiley, 2011.
166. Lis-Balchin, M. (2006). *Aromatherapy Science: A Guide For Healthcare Professionals*. Pharmaceutical Press.
167. Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., & Nerin, C. (2005). Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6939-6946.
168. Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323-327.
169. Luch, A. (Ed.). (2009). *Molecular, clinical and environmental toxicology* (Vol. 101). Springer.
170. Maffei, M., Chialva, F., & Sacco, T. (1989). Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves. *New Phytologist*, 111(4), 707-716.
171. Makhloufi, A. (2013). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru (Doctoral dissertation).
172. Mallea, M., Soler, M., Anfosso, F., & Charpin, J. (1979). Activité antifongique d'essences aromatiques. *Pathol. Biol*, 27, 597-602.
173. Mann, C. M., & Markham, J. L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84(4), 538-544.
174. Manou, I., Bouillard, L., Devleeschouwer, M. J., & Barel, A. O. (1998). Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, 84(3), 368-376.

175. Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E., & Romagnoli, C. (2004). Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological Research*, 159(3), 295-304.
176. Martini, M. C. (2011). *Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie*. <http://www.lavoisier.fr/>.
177. Matasyoh, J. C., Wagara, I. N., Nakavuma, J. L., & Kiburai, A. M. (2011). Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. *Afr. J. Food Sci*, 5(3), 138-142.
178. Mathieu, M. J., & Fonteneau, J. M. (Eds.). (2008). *Le manuel porphyre du préparateur en pharmacie: préparation du BP, formation continue*. Wolters Kluwer France.
179. McVicar, J. (2006). *Le grand livre des herbes: jardin, santé, cuisine, maison*. Editions de Borée.
180. Meincken, M., Holroyd, D. L., & Rautenbach, M. (2005). Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10), 4085-4092.
181. Meyer-Warnod, B. (1984). Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. *Perfumer&flavorist*, 9(2), 93-104.
182. Milpied, H. (2009). *PROGRES EN DERMATO-ALLERGOLOGIE. GERDA. BORDEAU 2009* (Vol. 15). John LibbeyEurotext.
183. Mishra, A. K., & Dubey, N. K. (1994). Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1101-1105.
184. Mohammedi, Z., & Atik, F. (2012). Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. *Revue «Nature & Technologie»*. n, 35.
185. Monnet, D. L. (2000, May). Consommation d'antibiotiques et résistance bactérienne. In *Annales francaises d'anesthésie et de réanimation* (Vol. 19, No. 5, pp. 409-417). Elsevier Masson.
186. Montes-Belmont, R., & Carvajal, M. (1998). Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection*, 61(5), 616-619.
187. Monti, D., Chetoni, P., Burgalassi, S., Najarro, M., Saettone, M. F., & Boldrini, E. (2002). Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. *International journal of pharmaceutics*, 237(1), 209-214.
188. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for dilution susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In: *Approved standard M7-A5*. Fourth Edition. Villanova, Pa: NCCLS; 2000;
189. Ncube, N. S., Afolayan, A. J., & Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7(12).
190. Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., & Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 20(2), 157-160.
191. Nelly, G. (2007). *L'Aromathérapie tout simplement*, éditions.
192. Nielsen, P. V., & Rios, R. (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2), 219-229.
193. Nikaido H. (1996). Outer membrane. In: F. C. Neidhardt, (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology* (Vol. 1, pp. 29-47). Washington, DC: ASM Press
194. Nychas, G. J. E. (1995). Natural antimicrobials from plants. In *New methods of food preservation* (pp. 58-89). Springer US.

195. Ogunlana, E. O., Höglund, S., Onawunmi, G., & Sköld, O. (1987). Effects of lemongrass oil on the morphological characteristics and peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* cells. *Microbios*, 50(202), 43.
196. Ollier, C. (2011). *Conseil en phytothérapie 2ème édition*. Editions Pro-Officina.
197. Onawunmi, G. O. (1988). In vitro studies on the antibacterial activity of phenoxyethanol in combination with lemon grass oil. *Die Pharmazie*, 43(1), 42.
198. Onawunmi, G. O., & Ogunlana, E. O. (1986). A study of the antibacterial activity of the essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf). *Pharmaceutical Biology*, 24(2), 64-68.
199. Onawunmi, G. O., Yisak, W. A., & Ogunlana, E. O. (1984). Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Journal of Ethnopharmacology*, 12(3), 279-286.
200. Opalchenova, G., & Obreshkova, D. (2003). Comparative studies on the activity of basil—an essential oil from *Ocimum basilicum* L.—against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *Journal of Microbiological methods*, 54(1), 105-110.
201. Ouraïni, D., Agoumi, A., Ismaïli-Alaoui, M., Alaoui, K., Cherrah, Y., Alaoui, M. A., & Belabbas, M. A. (2007). Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie*, 5(1), 6-14.
202. Oussou, K. R., Kanko, C., Guessend, N., Yolou, S., Dosso, M., N'Guessan, Y. T., & Koukoua, G. (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10), 1081-1086.
203. Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., & Portaels, F. (2002). Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), 2720-2722.
204. Paranagama, P. A., Abeysekera, K. H. T., Abeywickrama, K., & Nugaliyadde, L. (2003). Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, 37(1), 86-90.
205. Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., & Zachariah, T. J. (Eds.). (2008). *Chemistry of spices*. CABI.
206. Patel, J. D., Venkataramu, K., & Subba Rao, M. S. (1983). Antifungal activity of orange and lime oils. *Journal of food science and technology*, 20(5), 250-252.
207. Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M., & Kole, C. R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89(358), 39-46.
208. Pellecuer, J., Allegrini, J., & Simeon de Buochberg, M. (1976). Huiles essentielles bactéricides et fongicides. *Revue de l'institut Pasteur de Lyon*, 9, 135-159.
209. Pellecuer, J., Jacob, M., Simeon de Buochberg, M., Dusart, G., Attiso, M., Barthez, M., ... & Tomei, R. (1980). Essais d'utilisation d'huiles essentielles de plantes aromatiques méditerranéennes en odontologie conservatrice [pouvoir antibactérien]. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 14.
210. Peter, K. V. (Ed.). (2004). *Handbook of Herbs and Spices: Volume 2* (Vol. 2). Woodhead publishing.
211. Pfaller, M. A., Messer, S. A., & Coffmann, S. (1995). Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution

- methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5), 1094-1097.
212. Pibiri, M. C. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Federal Polytechnic Institute, Lausanne, Suisse (infoscience. epfl. ch: thesis-3311).
  213. Pibiri, M. C., & Roulet, C. A. (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles (No. oai: infoscience. epfl. ch: thesis-3311).
  214. Pibiri, M. C., Goel, A., Vahekeni, N., & Roulet, C. A. (2006). Indoor air purification and ventilation systems sanitation with essential oils. *International Journal of Aromatherapy*, 16(3), 149-153.
  215. Pietrella, D., Angiolella, L., Vavala, E., Rachini, A., Mondello, F., Ragno, R., & Vecchiarelli, A. (2011). Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC complementary and alternative medicine*, 11(1), 18.
  216. Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.
  217. Pousset, J. L. (2004). Plantes médicinales d'Afrique: comment les reconnaître et les utiliser. Secum/Edisud.
  218. Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 39.
  219. Purohit, P., & Kapsner, T. R. (1994). Natural essential oils: functional benefits. *Cosmetics and toiletries*, 109(6), 51-55.
  220. Raaman, N. (2006). *Phytochemical techniques*. New India Publishing.
  221. Rai, M. K., & Mares, D. (Eds.). (2003). Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects. Psychology Press.
  222. Rai, M. K., & Chikindas, M. L. (Eds.). (2011). *Natural antimicrobials in food safety and quality*. Cabi.
  223. Rasooli, I., & Abyaneh, M. R. (2004). Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 15(6), 479-483.
  224. Raynaud, J. (2006). Prescription et conseil en aromathérapie. Éditions Tec & Doc.
  225. Regnier, T., du Plooy, W., Combrinck, S., & Botha, B. (2008). Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 48(2), 254-258.
  226. Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M., & Tantaoui-Elaraki, A. (1993a). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of essential oil research*, 5(2), 179-184.
  227. Remmal, A., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., & Ettayebi, M. (1993b). Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 48(5), 352.
  228. Rhayour, K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*.
  229. Rhind, J. P. (2012). *Essential oils: a handbook for aromatherapy practice*. Singing Dragon.
  230. Riaud, X. (2010). *Histoires de la médecine bucco-dentaire*. l'Harmattan.
  231. Roux, D. (Ed.). (2008). Conseil en aromathérapie. Wolters Kluwer France.
  232. Roux, D., & Catier, O. (2007). Botanique Pharmacognosie Phytothérapie. Wolters Kluwer France.

233. Salle JL. (1991). Le totum en phytothérapie : Approche de phyto-biothérapie. Edition Frison-Roche, Paris, pp: 12-35.
234. Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Fougrach, H., Bourkhiss, B., ... & Talbi, M. (2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux, 146, 85-89.
235. Sawamura, M. (Ed.). (2011). Citrus essential oils: flavor and fragrance. Wiley. com.
236. Sayous, D. J., & Chevallier, J. (2008). La cosmétique bio (Vol. 10). Editions Eyrolles.
237. Scimeca, D., & Tétou, M. (2005). Votre santé par les huiles essentielles. Alpen Editions sam.
238. Serrato-Valenti, G., Bisio, A., Cornara, L., & Ciarallo, G. (1997). Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany*, 79(3), 329-336.
239. Shapiro, S., Meier, A., & Guggenheim, B. (1994). The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral microbiology and immunology*, 9(4), 202-208.
240. Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3), 337-344.
241. Shiva, M. P., Lehri, A., & Shiva, A. (2002). *Aromatic & medicinal plants: yielding essential oil for pharmaceutical, perfumery, cosmetic industries and trade*. Dehradun: International Book Distributors.
242. Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M. P., & Catalan, C. (2006). Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*, 17(9), 745-752.
243. Skaltsa, H. D., Demetzos, C., Lazari, D., & Sokovic, M. (2003). Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry*, 64(3), 743-752.
244. Solórzano-Santos, F., & Miranda-Navales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 136-141.
245. Sookhee S., Krisanaprakornkij S., Chatmahamongkol W., Muttarak W., Wattanarat C., Somjittra P., Manosroi J., Manosroi A. (2003). Anticandidal activity of 18 essential oils extracted from Thai medicinal plants. p.449. In Programme and Abstract, the 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare (WOCMAP III) 3-7 February 2003 Chiang Mai, Thailand.
246. Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O., & Trajano, V. N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18(5), 409-413.
247. Soylu, E. M., Tok, F. M., Soylu, S., Kaya, A. D., & Evrendilek, G. A. (2005). Antifungal activities of the essential oils on post-harvest disease agent *Penicillium digitatum*. *Pakistan Journal of Biological Science*, 8, 25-29.
248. Spichiger, R. E. (2002). *Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales*. PPUR presses polytechniques.
249. Sridhar, S. R., Rajagopal, R. V., Rajavel, R., Masilamani, S., & Narasimhan, S. (2003). Antifungal activity of some essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7596-7599.
250. Su, H. J., Chao, C. J., Chang, H. Y., & Wu, P. C. (2007). The effects of evaporating essential oils on indoor air quality. *Atmospheric Environment*, 41(6), 1230-1236.

251. Sultanbawa, Y., Cusack, A., Currie, M., & Davis, C. (2009). An innovative microplate assay to facilitate the detection of antimicrobial activity in plant extracts. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 17(4), 519-534.
252. Sun Og Lee, Gyung Ja Choi, Kyoung Soo Jang, He Kyoung Lim, Kwang Yun Cho and Jin-Cheol Kim. (2007). Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soil borne. *Plant Pathogenic Fungi. Plant Pathology Journal*. 23(2): 97-102.
253. Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3197-3207.
254. Syed, M., Khalid, M. R., & Chaudhary, F. M. (1990). Essential oils of Gramineae family having antibacterial activity. Part-1. (*Cymbopogon citratus*, *C. martinii* and *C. jawarancusa* oils). *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 33.
255. Takarada, K., Kimizuka, R., Takahashi, N., Honma, K., Okuda, K., & Kato, T. (2004). A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral microbiology and immunology*, 19(1), 61-64.
256. Tavares, A. C., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Lopes, M. C., Canhoto, J., & Salgueiro, L. R. (2008). Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 129-134.
257. Tchoumboungang, F., Dongmo, P. M. J., Sameza, M. L., Mbanjo, E. G. N., Fotso, G. B. T., Zollo, P. A., & Menut, C. (2009). Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnologie Agronomie Société Environnement*, 13(1), 77-84.
258. Telphon, T., & de Paillette, I. (2003). ABC des huiles essentielles. Grancher.
259. Tennstedt, D. (2004). Peau et moustiques. *Progrès en dermato-allergologie: Lille 2004*, 10, 91.
260. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90(3), 333-340.
261. Teuscher, E., Anton, R., & Lobstein, A. (2005). *Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et leurs huiles essentielles*. Tec et Doc.
262. Thomsen, P. S., Jensen, T. M., Hammer, K. A., Carson, C. F., Mølgaard, P., & Riley, T. V. (2011). Survey of the antimicrobial activity of commercially available Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil products in vitro. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 17(9), 835-841.
263. Thormar H. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. J. Wiley, 2011.
264. Tisserand, R., & Balacs, T. (1995). *Essential oil safety: a guide for health care professionals* (Vol. 12). London: Churchill Livingstone.
265. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2010). Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 65.
266. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126(1), 228-235.
267. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2012). Bactericidal action of lemon grass oil vapors and negative air ions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 169-177.
268. Valero, M., & Salmeron, M. C. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1), 73-81.



269. Valnet, J., Ch, D., & Duraffourd, P. (1978). L'Aromatogramme, nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 12.
270. Vazquez, J. A., & Zawawi, A. A. (2002). Efficacy of alcohol-based and alcohol-free melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole-refractory oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS. *HIV clinical trials*, 3(4), 379-385.
271. Vendeville, F., Loisel, M., & Guide, M. (1991). Intérêt d'une technique d'aromatogramme en phase liquide interprétable en quatre heures. *Phytotherapy*, (36-37), 20-24.
272. Viljoen, A., van Vuuren, S., Ernst, E., Klepser, M., Demirci, B., Başer, H., & van Wyk, B. E. (2003). *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2), 137-143.
273. Wajzman, J., Lozano, Y., & Chemat, F. Extraction, séparation et purification: du végétal à l'éco-extrait.
274. Walton, N. N. J., & Brown, D. D. E. (Eds.). (1999). *Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products*. World Scientific.
275. Wan J, Wilcock A, Coventry MJ (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology* 84: 152-8
276. Wang, S. Y., Chen, P. F., & Chang, S. T. (2005). Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 96(7), 813-818.
277. Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163-175.
278. Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. (2005). Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytotherapy Research*, 19(7), 643-646.
279. Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, T., & Cavanagh, H. M. (2003). Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 76-81.
280. Worwood, V. A. (2012). *The complete book of essential oils and aromatherapy: over 600 natural, non-toxic & fragrant recipes to create health beauty a safe home environment*. New world library.
281. Yang, L., Ouyang, Z., Han, L., Su, S. L., & Wang, M. (2007). Comparative Study on Different Extraction Methods on Essential Oil of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 5.
282. Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.
283. Zambonelli, A., d'Aulerio, A. Z., Bianchi, A., & Albasini, A. (1996). Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. *Journal of Phytopathology*, 144(9-10), 491-494.
284. Zhiri, A., & Baudoux, D. (2005). *Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies: aromathérapie scientifique*. Luxembourg: Édition Inspir Development.
285. Zhiri, A., & Baudoux, D. (2005). *Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies: aromathérapie scientifique*. Luxembourg: Édition Inspir Development.

Table 1- Seuil d'efficacité (Concentration Minimale Inhibitrice) des huiles essentielles sélectionnées contre quatre bactéries pathogènes

| Huiles essentielles     |                               |                  |   | Concentration minimale inhibitrice (CMI) <sup>2</sup> pour chaque bactérie testée (%) |                   |                 |                         |
|-------------------------|-------------------------------|------------------|---|---|-------------------|-----------------|-------------------------|
| Nom commun              | Origine utilisée <sup>1</sup> | partie de plante | Composés majoritaires de l'HE en (%)                  | <i>E.coli</i>   | <i>Salmonella</i> | <i>S.aureus</i> | <i>L.mono cytogenes</i> |
| Cannelle de Chine       | Chine                         | Rameau           | Cinnamaldehyde (65), methoxy-cinnamaldehyde (21)      | 0,05  | 0,025             | 0,025           | 0,05                    |
| Cannelle de Ceylan      | Skri Lanka                    | Écorce           | Cinnamaldehyde (87)                                   | 0,025   | 0,05              | 0,025           | 0,05                    |
| Cannelle de Ceylan      | Madagascar                    | Feuilles         | Eugenol (63), β-caryophyllene (5)                     | 0,1   | 0,1               | 0,05            | 0,2                     |
| Coriandre               | Russie                        | Fruit            | Linalool (70), α-pinene (6)                           | 0,2   | 0,2               | 0,2             | >0,8                    |
| Origan d'Espagne        | Espagne                       | Plante en fleur  | Carvacrol (76), thymol (5%)                           | 0,025   | 0,025             | 0,013           | 0,025                   |
| Schénanthe              | Guatemala                     | Herbe            | Geranial (45), neral (32), limonene (9)               | >0,8  | 0,8               | 0,1             | 0,4                     |
| Lemongrass              | Inde                          | Herbe            | Geranial (46), neral (31)                             | >0,8  | 0,4               | 0,1             | 0,4                     |
| Palmarose               | Inde                          | Herbe            | Geraniol (80), geranyl acetate (9)                    | 0,2   | 0,2               | 0,1             | 0,2                     |
| Citronnelle de Ceylon   | Skri Lanka                    | Herbe            | Geraniol (19), limonene (10), camphene (9)            | >0,8  | 0,8               | 0,4             | 0,8                     |
| Citronnelle de Java     | Vietnam                       | Herbe            | Citronnellal (34), geraniol (21), Citronnellol (11)   | >0,8  | 0,4               | 0,05            | 0,4                     |
| Clou de girofle         | Madagascar                    | fleur            | Eugenol (78), eugenyl acetate (14)                    | 0,1   | 0,1               | 0,05            | 0,2                     |
| Inule odorante          | France                        | Plante en fleur  | Bornyl acetate (51), borneol (23), camphene (7)       | >0,8  | >0,8              | 0,2             | 0,8                     |
| Lavandin reydovan       | France                        | Plante en fleur  | Linalool (51), linalyl acetate (19), camphor (8)      | >0,8  | 0,4               | 0,8             | >0,8                    |
| Lavande aspic à cinéole | France                        | Plante en fleur  | Linalool (34), 1,8-cineole (22), camphor (15)         | >0,8  | 0,8               | 0,2             | >0,8                    |
| Melaleuque à feuilles   | Australie                     | Feuilles         | Terpine-ol-4 (30), γ-terpinene (19), 1.8 cineole (14) | >0,8  | 0,8               | 0,4             | >0,8                    |
| Origan à inflorescences | Maroc                         | Plante en fleur  | Carvacrol (22), γ-terpinene (23), thymol (19)         | 0,025   | 0,05              | 0,013           | 0,1                     |
| Origan de Grèce         | France                        | Plante en fleur  | Carvacrol (54), paracymene (14), γ-terpinene (14)     | 0,025   | 0,05              | 0,013           | 0,05                    |
| Marjolaine des jardins  | Egypte                        | Plante en fleur  | Terpinene-4-ol (26), γ-terpinene (12), thuyanol (10)  | >0,8  | 0,4               | 0,2             | >0,8                    |
| Piment                  | Antilles                      | Feuilles         | Eugenol (48), myrcene (27), geraniol (10)             | 0,1   | 0,1               | 0,1             | 0,2                     |
| Sarriette des jardins   | France                        | Plante en fleur  | Carvacrol (41), γ-terpinene (33), p-cymene (6)        | 0,05  | 0,05              | 0,013           | 0,1                     |
| Sarriette des montagnes | Slovenie                      | Plante en fleur  | Thymol (43), p-cymene (12), γ-terpinene (9)           | 0,05  | 0,05              | 0,013           | 0,05                    |
| Thym sauvage            | Spain                         | Plante en fleur  | 1,8-cineole (47), linalool (24), limonene (7)         | >0,8  | >0,8              | 0,8             | >0,8                    |
| Thym à bornéol          | Maroc                         | Plante en fleur  | Borneol (26), camphene (9), carvacrol (7)             | 0,2   | 0,2               | 0,05            | 0,4                     |
| Serpolet                | Albanie                       | Plante en fleur  | Cavacrol (23), p-cymene (20), γ-terpinene (18)        | 0,1   | 0,1               | 0,05            | 0,2                     |
| Thym à carvacrol        | France                        | Plante en fleur  | Cavacrol (33), p-cymene (24), thymol (12)             | 0,05  | 0,05              | 0,025           | 0,1                     |
| Thym à linalol          | France                        | Plante en fleur  | Linalool (60), linalyl acetate (10)                   | >0,8  | 0,2               | 0,1             | >0,8                    |
| Thym à thujanol         | France                        | Plante en fleur  | Trans-thujanol-4 (44), mycene 8-ol (13)               | 0,8   | 0,4               | 0,4             | >0,8                    |
| Thym à thymol           | France                        | Plante en fleur  | Thymol (38), p-cymene (19), γ-terpinene (17)          | 0,05  | 0,1               | 0,025           | 0,2                     |

<sup>1</sup>Chaque huile essentielle possède une activité spécifique variable selon les microorganismes et les conditions environnementales.

<sup>2</sup>Le seuil d'efficacité ou concentration minimale inhibitrice (CMI) est défini comme étant la plus faible concentration en huile capable d'inhiber toute croissance bactérienne. Ces résultats expérimentaux ont été obtenus dans un milieu modèle et sont donnés à titre indicatif. Pour toute application, des études préalables sont nécessaires pour déterminer le seuil d'efficacité dans l'aliment.



**Tableau 2** : Principales localisations géographiques du Thym en Algérie  
D'après Quezel et Santa (1963) .

| <b>Espèce</b>                                       | <b>Localisation et caractéristique</b>   |
|---|--|
| <i>Thymus pallescens</i><br>(Boiss. et Reuter)      | - commun dans le tell<br>- endémique algérien.   |
| <i>Thymus capitatus</i> (L.)<br>(Hoffmann et Link.) | très rare dans le sous secteur de l'Atlas tellien  |
| <i>Thymus dreatensis</i> Batt.                      | très rare dans le sous secteur du Tell constantinois et de la petite Kabylie.  |
| <i>Thymus Numidicus</i><br>(Poiret)                 | assez rare dans :<br>le sous secteur de l'atlas tellien, le secteur du Tell constantinois et petite et grande Kabylie.   |
| <i>Thymus guyonii</i><br>(De Noé)                   | rare dans :<br>le sous secteur des Hauts plateaux algérois, oranais et Constantinois.  |
| <i>Thymus Lanceolatus</i><br>(Desf.)                | rare dans<br>- le sous secteur de l'Atlas tellien (Terni) et de l'Atlas Tellien (Médéa, Benchicao).<br>- le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais (Tiaret) et Sour El Ghozlane (Aumale). |
| <i>Thymus pallidus</i> (Coss.)                      | très rare dans le sous secteur de l'Atlas saharien Constantinois.  |
| <i>Thymus glandulosus</i> (Lag.)                    | très rare dans le sous secteur des Hauts plateaux algérois et oranais.   |
| <i>Thymus hirtus</i> (Willd.)                       | commun sauf sur le littoral  |
| <i>Thymus algériensis</i> (Boiss. et Reuter)        | très commun dans toutes les régions montagneuses et rares ailleurs.  |
| <i>Thymus munbyanus</i><br>(Desf.)                  | endémique dans le nord du secteur algérois   |

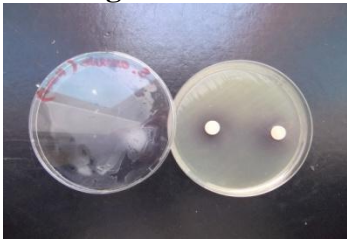
**Tableau 3** : Composition chimique de l'huile essentielle de quelque espèce de Thym

| Auteurs                 | Espèces                        | Composants majoritaires   | Pays     |
|-------------------------|--------------------------------|---|----------|
| Giordani et al.<br>[51] | <i>Thymus numidicus</i>        | Thymol (66,31-57,20%); $\gamma$ -Terpinène (6,12-9,19%)<br>carvacrol (4,31-2,20%); Linalool (8,62-9,26%)  | Algérie  |
|                         | <i>Thymus ciliatis</i>         | Thymol (60,52%) ; $\gamma$ -Terpinène(9,45%)<br>$\rho$ - cymène (8,10%)                                   |          |
|                         | <i>Thymus vulgaris</i>         | $\rho$ - cymène (26,36%); Thymol (25,57%)<br>Thymol (60,52%) ; thymoquinone(10,50%)                       |          |
| Kabouche et al.<br>[52] | <i>Thymus numidicus</i>        | Thymol (68,2%) ; carvacrol (16,9%)<br>Linalool (11,5%)  | Algérie  |
| Kabouche et al.<br>[53] | <i>Thymus pallescens</i>       | Thymol (67,8%) ; $\gamma$ -Terpinène(15,9%)<br>$\rho$ - cymène (13%) ; carvacrol (1,7%)                   | Algérie  |
| Hadeif et al.<br>[54]   | <i>Thymus numidicus</i>        | Thymol (60,8%) ; $\gamma$ -Terpinène(7,6%)<br>$\rho$ - cymène (10,3%) ; carvacrol (5,1%)<br>Linalool (8%) | Algérie  |
|                         | <i>Thymus vulgaris</i>         | Thymol (25,4%) ; $\rho$ - cymène (26,2%)<br>carvacrol (11,3%); thymoquinone(10,42%)                       |          |
| Bouhdid et al.<br>[55]  | <i>Thymus satureioides</i>     | Borneol (26,4%) ; Thymol (11,48%)<br>carvacrol (8,76%)  | Maroc    |
|                         | <i>Thymus vulgatis</i>         | Thymol (36,58%) ; $\gamma$ -Terpinène(16,51%)<br>$\rho$ - cymène (13,70%)                                 | France   |
|                         | <i>Corydanthymus capitatus</i> | carvacrol (59,50%) ; Thymol (7,37%)   | Espagne  |
| Tepe et al.<br>[56]     | <i>Thymus sipyleus</i>         | Thymol (20,5%) ; $\gamma$ -Terpinène(4,4%)<br>$\rho$ - cymène (4,1%) ; carvacrol (58,1%)                  | Turquie  |
| Tomaino et al.<br>[57]  | <i>Thymus vulgatis</i>         | Thymol (45,3%) ; Linalool (61,7%)   | France   |
| Nickvar et al.<br>[58]  | <i>Thymus daenesis</i>         | Thymol (74,4%) ; $\beta$ -caryophyllène(3,8%)<br>$\rho$ - cymène (6,5%) ; méthyl carvacrol(3,6%)          | Iran     |
|                         | <i>Thymus kotschyamus</i>      | Thymol (38,6%) ; $\gamma$ -Terpinène(8,2%)<br>$\rho$ - cymène (7,3%) ; carvacrol (33,9%)                  |          |
| Miguel et al.<br>[59]   | <i>Thymus caespitititus</i>    | Riche en $\alpha$ - terpinéol(32,1%)  | Portugal |
|                         | <i>Thymus camphoratus</i>      | Riche en 1,8- cinéole(57,8%)  |          |
|                         | <i>Thymus mastichina</i>       | Linalool (16,6%) ; Acetate de linalyle (15,2%)<br>1,8- cinéole(10,8%)                                     |          |
| Faleiro et al.<br>[60]  | <i>Thymus lotocephatus</i>     | Riche en linalool (11,4%)   | Portugal |
|                         | <i>Thymus camphoratus</i>      | Riche en 1,8- cinéole(56,7%)  |          |
|                         | <i>Thymus mastichina</i>       | linalool (44,4%) ; 1,8- cinéole(37,4%)  |          |
| Karaman et al.<br>[61]  | <i>Thymus revolutus</i>        | carvacrol (43,13%) ; $\gamma$ -Terpinène(20,86%)<br>$\rho$ - cymène (13,94%)                              | Turquie  |

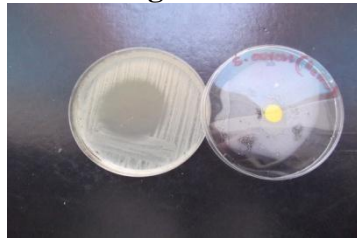
**Aromatogramme**

**microtmosphère**

**1-2gouttes**



**1goutte**



**2gouttes**

