

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة جيلالي بونعامة خميس مليانة

Université Djilali Bounaama Khemis Miliana

Faculté: Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre

Département: Sciences Agronomiques

Spécialité: Sciences et Techniques des Productions Animales



Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

**Etude de l'activité antibactérienne et antioxydante des huiles
essentielles de *Thymus vulgaris L***

Réalisé par :

M^{elle} laissaoui naima

M^{elle} Tahi Lwiza

Promoteur: AIT OUAZZOU Abdenour

MCA

Invité : BOUDJELLAL Fayssal

Président : KOUACHE Ben moussa

MAA

Examineurs :

1-MOUSS Abdelhak karim

MAA

2- GHOZLANE Mohammed Khalil

MAA

Année universitaire: 2015/2016

Remerciements

Avant tout nous remercions Allah le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la patience pour faire ce travail.

Qu'il nous soit permis de remercier tous ceux qui d'une manière ou d'une autre, de près ou de loin, y ont contribué.

Nos remerciements s'adressent en particulier à :

Mr AITOUZOU notre promoteur pour leur encadrement, pour leurs conseils scientifiques judicieux et leur suivi durant la période de la réalisation de ce travail.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance et notre vifs Remerciements au Mr KOUACHE Ben moussa pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité.

Nous remercions Mr KOUACHE Ben moussa d'avoir accepté la présidence du jury

De notre travail, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.

Nous exprimons nos respectueux remerciements aux membres de jury : Mr MOUSS Abdelhak Karim et Mr GHOLLANE Mohammed Khalil, pour avoir acceptés d'évaluer ce travail.

Aux personnels du laboratoire de chimie 02 d'université de Djilali Bounaama de khemis Miliana pour leur aide, en particulier Mr BOUDJELLAL Fayassa, notre Co-encadreur.

Nous remercions également tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à la réalisation de notre mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail.

*À ma source de tendresse, l'être la plus chère dans le monde, la
femme la plus patiente*

Ma chère mère.

À mon père

À mes chers frères : Abed El Kader, Mohamed et Mourade

À mes chères sœurs : Djamila, Fatiha Foziya Hakima

À toute ma familles Laissaoui et Kifouche et tous mes amis

Amira , Fatima , Habiba , Karima , Lwiza , Salma et Zinab

À toute promotion STPA 2016

Naima .L

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents

A mes grand-pères et mes grand-mères

A mes chers frères et sœurs

A toute ma famille TAHI et MATAOUI

Ainsi que pour toutes mes amies

A toute promotion STPA 2016

Lwiza .T

المخلص

في إطار استغلال النباتات الجزائرية كان عملنا مرتكزا على نبتة من منطقة المخاطرية ولاية عين الدفلى، زيادة لوفرتها وكثرة استعمالها، في هذا المجال ارتكز عملنا على دراسة الخصائص الفيزيوكيميائية لزيت نبتة الزعتر، وكذلك تم تقييم النشاط المضاد للاكسدة و النشاط المضاد للبكتيريا لسلاطين من البكتيريا الممرضة (*S. aureus* و *E. coli*)، وكشفت النتائج التي تم الحصول عليها في ضوء هذه الدراسة نشاط قوي للبكتيريا، واطهر هذا الزيت قدرة مضادة للاكسدة و ذلك بالمقارنة مع حمض الاسكوربيك، من خلال استخدام طريقة اختبار صيد جذور DPPH• واستخدام التركيزات المثبطة IC 50 وتقييمها ب 3,40 ميكروولتر/مليتر للزيت الأساسي المستخلص و 5,15 ميكروولتر/مليتر لحمض الاسكوربيك

الكلمات المفتاحية : الزعتر(الغدة الصعترية الشائع)، الزيت الأساسي، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للاكسدة، DPPH•.

Abstract

And within the framework of the valorization of the Algerian flora, we focused on the thymus vulgaris L plant from the common area of El Mekhatria, although widely used. In this context, our work focused on the study of essential oil physicochemical characterization of *Thymus vulgaris* L, also the antibacterial activity vis-à-vis two pathogenic bacterial strain *E. coli* and *S. aureus* and antioxidant. The results obtained in the light of this study revealed a strong bactericidal activity. This oil showed good antioxidant capacity compared to vitamin C. The best EC50 (40,3µl / ml) is assigned to the essential oil that has been able to reduce the DPPH radical steady results in violet color change yellow by an EC50 against equal to (15, 5 .µl / ml).

Keywords: *Thymus vulgaris* L, essential oil, antibacterial activity, antioxidant activity, DPPH•.

Résumé

Dans le cadre de la valorisation de flore algérienne, on s'est intéressé sur la plante de thymus vulgaris L provenant de la région de commune d'El mekhatria, bien que largement utilisée. Dans ce contexte, notre travail est fondé sur l'étude de caractérisation physicochimique de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* L, aussi de l'activité antibactérienne vis-à-vis deux souche bactériennes pathogènes *E. coli* et *S. aureus* et l'activité antioxydante. Les résultats obtenus à la lumière de cette étude ont révélés une forte activité bactéricide. Cette huile a montré une bonne capacité antioxydante comparant à l'acide ascorbique. Le meilleur CE50 (40,3µl/ml) est attribué à l'huile essentielle qui a été capable de réduire le radicale stable DPPH• traduit par le changement de couleur de violet au jaune par contre un CE50 égale à (15,5 µl/ml).

Mots clés : *thymus vulgaris* L, huile essentielle, activité antibactérienne, activité antioxydante, DPPH•.

La liste des abréviations

- K O H** : Hydroxyde de potassium.
- A F N O R** : Association Française de Normalisation.
- ATCC** : American type culture collection
- C P G** : Chromatographie en phase gazeuse.
- CG/SM**: Chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de masse.
- DPPH** : 2, 2'-diphényl-1 -picrylhydrazyle.
- E.coli** : Escherichia coli.
- ED** : Eau distillée.
- FRAP**: pouvoir antioxydant par réduction de fer
- Hcl** : Acide chlorhydrique.
- HD** : Hydrodistillation.
- HE** : Huile essentielle
- Ia** : Indice d'acide
- IC50** : Concentration inhibitrice de 50%.
- Ie** : Indice d'ester.
- IR** : Indice de réfraction.
- M** : Masse molaire
- M H** : Muller-Hinton.
- M HE** : Masse en huile essentielle.
- mol/l** : mole/Litre.
- MS** : La quantité de la matière végétale sèche.
- N** : Normalité.
- pH** : Potentiel d'Hydrogène.
- RHE** : Rendement en HE.
- S. aureus** : *Staphylococcus aureus*.
- SM**: Spectrométrie de masse.
- T.S.B**: Tryptone Soy de broth.
- UFC** : Unité Formant Colonie.

La liste des Figures

Figure 01: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	15
Figure 02: Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur	16
Figure 03: Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse	18
Figure 04: photo de vue générale de localisation de région de cueillette (Boukaaben) commune d'el Mekhatria (photo personnelle)	28
Figure 05 : photo de <i>Thymus vulgaris</i> (photo personnelle)	29
Figure 06: photo de <i>Thymus vulgaris</i> sec (photo personnelle)	30
Figure07 : photo d'appareil de l'hydro distillation (Clevenger) (photo personnelle)	32
Figure 08: photo de Centrifugeuse (photo personnelle)	39
Figure09: photo de précipitation (micro-organismes) (photo personnelle)	40
Figure10 : Illustration de la méthode de diffusion en gélose.	41
Figure 11 : photo d'huile essentielle de <i>thymus vulgaris</i> (photo personnelle)	43
Figure 12: Evolution de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration.	45
Figure 13 : Photos montrant l'effet de huile essentielle pure de <i>thymus vulgaris</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>E-coli</i> (photo personnelle)	47

La liste des tableaux

Tableau 01 : localisation des principales espèces du thym en Algérie	06
Tableau02: Récapitulation des principales huiles essentielles produites et des principaux pays producteurs dans le monde en 2008	09
Tableau 03. Les parties de certaines plantes riches en huiles essentielles	10
Tableau 04: Bactéries utilisés	30
Tableau 05 : caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i>	42
Tableau 06 : caractères physico-chimiques des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i>	43
Tableau 07: Analyse CPG des huiles essentielles de <i>Thymus Vulgaris</i>	44
Tableau 08: valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition	47
Tableau 09 : Dénombrement bactérien	48

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

I. Introduction 01

II. Revue Bibliographique

Chapitre 1 : Les plantes aromatique

II.1.1. Historique des plantes aromatiques	03
II.1.2. Les plantes aromatiques.....	03
II.1.3. Présentation de la famille des <i>Lamiacées</i>	03
II.1.4. <i>Le Thym</i>	04
II.1.4.1. Caractéristiques botaniques.....	04
II.1.4.2. Description.....	04
II.1.4.3. Classification botanique des <i>Thymus vulgaris</i>	05
II.1.4.4. Les principales espèces du genre <i>Thymus</i>	05
II.1.4.5. Répartition géographique.....	05
II.1.4.5.1. Dans le monde.....	05
II.1.4.5.2. En Algérie	05
II.1.4.6. Les propriétés du <i>Thym</i>	07

Chapitre 2 : Les huiles essentielles

II.2.1. historique	08
II.2.2. Définition.....	08
II.2.3. Production mondiale des huiles essentielles.....	09
II.2.4. Localisation de l'H.E. Dans la plante	10
II.2.5. Fonction des huiles essentielles	11
II.2.6. Propriétés physiques	11
II.2.7. Composition chimique.....	12
II.2.8. Facteurs de variation de la composition chimique	12
II.2.8.1. Les facteurs intrinsèques.....	13
II.2.8.2. Les facteurs extrinsèques	13

II.2.9. Toxicité des huiles essentielles	14
II.2.10. Méthode d'extraction des huiles essentielles.....	15
II.2.10.1. Extraction par hydro distillation d'huile essentielle	15
II.2.10.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	16
II.2.10.3. Expression à froid	16
II.2.10.4. Extraction par solvants organiques	16
II.2.10.5. Extraction par CO ₂ supercritique.....	17
II.2.11. Méthodes de caractérisation des H.Es	17
II.2.11.1. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	17
II.2.11.2. La spectrométrie de masse (SM).....	19
II.2.11.3. Couplage CPG/SM.....	19
II.2.12. Utilisation des huiles essentielles	29
II.2.13. Conservation des huiles essentielles	20

Chapitre 3 : l'activité antioxydante

II.3.1. Activité antioxydant des huiles essentielles	21
II.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante	21
II.3.2.1. Blanchissement de la bêta-carotène: β -carotène bleaching method.....	21
II.3.2.2. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•).....	21
II.3.2.3. La méthode TEAC	22
II.3.2.4. La méthode TRAP	22
II.3.2.5. La méthode FRAP.....	23

Chapitre 4 : l'activité antibactérienne

II.4.1. Introduction.....	24
II.4.2. Les principales substances antimicrobiennes	24
II.4.2.1. Les antibiotiques	24
II.4.2.2. Les huiles essentielles	24
II.4.3. Les bactéries étudiées	25
II.4.3.1. <i>Escherichia coli</i>	25
II.4.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	26

III. matériels et méthodes

III.1. Objectif du travail.....	28
III.2. Présentation de la zone d'étude	28
III.3. Matériel utilisés	28

III.3.1. Matériel végétal	29
III.3.1.1. Identification botanique	29
III.3.1.2. Séchage de partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de <i>Thymus vulgaris</i>	30
III.3.1.3. Stockage des plantes séchées	30
III.4. Matériel biologique.....	30
III.5. Méthodes	30
III.5.1. Détermination de la teneur en eau	30
III.5.2. Détermination de la Matière sèche	31
III.5.3. Extraction des huiles essentielles.....	31
III.5.3.1. Hydro distillation	31
III.5.5. Calcul de rendement	32
III.5.6. Déterminations des caractères physiques	33
III.5.6.1. Caractères organoleptiques	33
III.5.6.2. La densité relative	33
III.5.6.3. L'indice de réfraction	34
III.5.6.4. Détermination de l'indice chimique.....	34
III.5.6.5. Indice D'acide	34
III.5.6.6. Indice D'ester	35
III.5.6.7. Indice de saponification Is	36
III.5.6.8. Détermination du pH.....	37
III.7. L'analyse par CPG/SM de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	37
III.8.L'activité antioxydante.....	38
III.9.Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne	39
III.9.1. Obtention des suspensions bactériennes	39
III.9.2. La dilution et dénombrement	39
III.9.3. Diffusion des disques sur gélose	40

IV. Résultats et discussions

IV.1.Détermination du teneur en eau et en matière sèche.....	42
IV.2.Le rendement	42
IV.3.Caractérisation de l'huile essentielle de thymus vulgaris	42
IV.3.1.Propriétés organoleptique.....	42
IV.3.2.caractères physico-chimiques des huiles essentielles de thymus vulgaris.....	43

IV.4.L'analyse par CPG de l'huile essentielle de Thymus vulgaris.....	44
IV.5.L'activité antioxydante	45
IV.6.L'activité antibactérienne.....	47
Conclusion.....	49
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction générale

La plante est un organisme vivant qui existe depuis l'antiquité. Elle constitue un maillon très important et fondamental dans le cycle biologique de vie des autres organismes vivant tel que les animaux aussi bien les être humain (**Medi, 2010**).

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique possédant un très large éventail d'activités biologiques (**zeghad, 2009**).

Dans le bagage chimique des plantes, les huiles essentielles, les alcaloïdes et autres composés phénoliques, représentent des molécules de fortes valeurs, utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires. Les activités antibactériennes de ces produits ont été rapportées dans de très nombreux travaux. (**Bouzouita et al, 2008 ; Kalemba et kunicka 2003 ; Burt, 2004; Bekhechi et al., 2008**).

Ces huiles ont une activité biologique et thérapeutique aussi variée, tel que les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. (**Svoboda et Hampson, 1999**).

L'Algérie possède une flore particulièrement riche en plantes utiles, ce qui lui confère une place privilégiée pour la culture et l'exploitation des plantes médicinales et aromatiques d' autant plus qu'un très grand nombre d'entre elles poussent à l'état spontané (**Gherbi., 1990, Bellouede , 2001**).

Dans le cadre de la valorisation des espèces végétales algériennes, appartenant à la famille des lamiacée et compte tenu des vertus thérapeutiques, nous nous sommes intéressés aux huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, provenant de la région de Mekhatria, wilaya d'Ain Defla.

Notre choix s'est porté sur l'espèce *Thymus vulgaris* L., très répandue dans cette wilaya à l'état spontanée et largement utilisée en médecine traditionnelle et en pâturage ovin.

Notre travail est divisé en deux parties, La première partie est consacré à une synthèse bibliographique, qui constitué de quatre chapitre : les plante aromatiques, les huiles essentielles et l'activité antibactérienne et antioxydante, La seconde partie concerne la partie expérimentale, qui comporte deux chapitres, l'un

sur les matériels et les méthodes de travail; Le deuxième chapitre regroupe l'ensemble des résultats qui seront suivis d'une discussion. Enfin nous avons terminés notre travail par une conclusion.

**Revue
bibliographiques**

II.1.1. Historique des plantes aromatiques:

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles. Ces dernières sont des produits à forte valeur ajoutée, utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires. L'étude des activités biologiques et biotechnologique des extraits de plantes est d'un grand intérêt. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles ont été rapportées dans plusieurs travaux (**Bouzouita et al., 2008**).

La Chine, berceau de la phytothérapie, l'Inde, le Moyen –Orient, notamment au cours de l'ère arabo-musulmane, l'Egypte, la Grèce, les romains, constituent des civilisations phares pendant lesquelles les plantes aromatiques et médicinales ont connu une place de premier plan. De nos jours entre 20 000 et 25 000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale (**Anthoula Adossides , 2003**).

II.1.2. Les plantes aromatiques:

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (**Yano et al, 2006**). Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme source d'antioxydants, qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant (**Mata et al, 2007**).

II.1.3. Présentation de la famille des *Lamiacées* :

La famille des *Lamiacées* est l'une des plus répandues dans le règne végétal. C'est une famille de grande importance aussi bien pour son utilisation dans l'industrie alimentaire et en parfumerie qu'en thérapeutique. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien,

antifongiques, anti-inflammatoire et antioxydant (**Gherman, 2000; Bouhdid, 2006; Hilan, 2006**). Il est bien connu que les huiles essentielles extraites des plantes de cette famille possèdent des propriétés pharmacologiques tant sur le plan humain qu'industriel. De nombreuses propriétés leurs sont conférées: anti-infectieuses, antispasmodiques, antalgiques, toniques, digestives, cicatrisantes. Les huiles essentielles par la diversité des constituants qui les composent, sont des substances très actives (**Bakkali,2008 ; Hilan ,2006**).

Cette famille comprend près de 6700 espèces regroupées dans environ 250 genres (**Miller et al , 2006**). La région méditerranéenne a été le centre principal pour la domestication et la culture de *Labiatae*, *Lamiaceae*, caractérisée par des plantes productrices d'huiles essentielles (**Naghbi et al, 2005**). Les genres les plus cités dans la littérature sont: *Salviaofficinalis*, *Menthaspicata*, *Origanumvulgare*, *Rosmarinum basilicum*, *Thymus vulgaris* (**Lee et al, 2005**).

II.1.4.Le Thym:

II.1.4.1.Caractéristiques botaniques:

II.1.4.2.Description:

Le nom *Thymus* vient probablement du latin "Thymus" qui signifie «parfumé» ou du grec "Thymos" qui signifie "courage" ou "force". La région méditerranéenne peut être décrite comme le centre de ce genre (**Stahl-Biskup et Saez, 2002**).

Le nombre d'espèces dans ce genre est encore discutable, il regroupe entre 250 et 350 espèces, sous-espèces et variétés de plantes sauvages (**Napoli et al, 2010**).

Les Thyms (*Thymus*) appelé en arabe zaater **Perrotet al (1999)**, Le Thym est un petit arbrisseau, formé de touffes compactes de 10 à 30 cm de hauteur. Ses tiges sont ramifiées, sessiles, petites et étroites de forme lancéolée, de couleur bleu vert. Les fleurs réunies en épis au sommet des branches ont un calice tubuleux se terminant par deux lobes. Le lobe inférieur comporte deux dents allongées et une corolle également tubuleuse et bilabée dont la lèvre supérieure est entière et la lèvre

inférieure découpée en trois petits lobes. Le fruit est formé de quatre akènes marrons et presque ronds (Quezel, 1962-1963).

II.1.4.3. Classification botanique des *Thymus vulgaris*

Règne	Plante
Sous règne	Plante vasculaire
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Labiales
Famille	Lamiacées
Genre	Thymus
Espèce	<i>Thymus vulgaris</i> L (Carl von Linné ,1753).

II.1.4.4. Les principales espèces du genre *Thymus*:

Il existe plusieurs variétés du Thym, différentes par la dimension des feuilles, leur pilosité, la disposition des fleurs et la composition de l'huile essentielle.

Thymus serpyllum (Thymus serpolet). (Jollois et al, 1990).

Thymus vulgaris (Thymus de France). (Perroti et al, 1999).

Thymus algériennes (Thymus d'Algérie). (Luncieme, 2007).

Thymus capitatus (Thymus de crête).

Thymus citriodorus (Thymus citronné). (Jollois et al, 1990).

Thymus bleicheranus (thym de l'Afrique du nord). (Benabid, 2000).

II.1.4.5. Répartition géographique:

II.1.4.5.1. Dans le monde:

Selon Dob et al (2006), 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 l'Ouest du Nord africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye), 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.

II.1.4.5.2.En Algérie

L’Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales en regard de sa superficie et sa diversité bioclimatique. Le genre *Thymus* de la famille des lamiacées ou labiées, internes jusqu’aux zones arides (**Haddaf, 2004**).

Tableau 01 : localisation des principales espèces du Thym en Algérie (**Quezel ,1962-1963**).

Espèces	Découverte par	localisation	Nom local
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et link	Rare dans la région de tlemcen	zaàteure
<i>Thymus fontanasii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le tell Endémique est algérie-tunisie	zaàteure
<i>Thymus commutatus</i>	Battandier	Endémique oran	-
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans : Le sous secteur de l’atlas tellien La grande et la petite kabylie De skikda à la frontière tunisienne, tell constantinois	tizaàtarte
<i>Thymus guyonii</i>	Noé	Rare dans lesous secteur des hauts plateaux algérois- oranais et constantinois	-
<i>Thymus lancéolatus</i>	Desfontaine	Rare dans : Le sous secteur de l’atlas tellien (terni de médéa benchicao) et dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais (taret) et constantinois	zaàteur

<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous secteur de l'atlas saharien, et constantinois	tizerdite
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral	Djertil hamrya

II.1.4.6. Les propriétés du *Thym*:

- Assaisonnement des aliments et des boissons.
- Antiseptique, désinfectant dermique et un spasmolytique bronchique dont il est indiqué pour traiter les infections des voies respiratoires supérieures.
- Les principaux constituants du Thym montrent des propriétés vermifuges et vermicides (**Bazylko et Strzelecka, 2007**).
- Propriétés antivirales, antifongiques, anti inflammatoires, et antibactériennes dont une étude récente a montré que les extraits méthanoliques et hexaniques des parties aériennes de *Thymus vulgaris* inhibent la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (bactérie qui cause la tuberculose) (**Jiminez-Arellanes et al, 2006**).
- Propriétés anthelminthiques (**Al-Bayati, 2008**).
- Propriétés antioxydantes (**Takeuchi et al, 2004; Golmakani et Rezaei, 2008**) en raison de ces propriétés, le thym est utilisé comme un conservateur afin de prolonger la durée de conservation des poissons *Thunnus thynnus* durant leur stockage (**Selmi et Sadok, 2008**).

II.2.1.historique :

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. (**Baser et Buchbauer, 2010**).

Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc. (**Besombes, 2008**)

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec la civilisation arabe, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques. (**Baser et Buchbauer, 2010**). Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice ATTEFOSSÉ a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches. (**Besombes, 2008**)

II.2.2. Définition :

Les huiles essentielles sont généralement des mélanges des principes volatils contenus dans les végétaux (**Bruneton, 1999**).

Les huiles essentielles, appelées également essences végétales, sont des produits de composition chimique assez complexes renfermant des principes actifs très volatils à température ambiante en particulier en présence de la vapeur d'eau. C'est à ces composés volatils que les plantes doivent leur odeur (**Fluck, 1977**)

Ce sont des liquides aromatiques appelés aussi essences aromatiques produites et emmagasinées dans certaines cellules de la matière végétale (**Brunton, 1993**).

Le nom « huile essentielle » a été conçu empiriquement : le terme « huile »

soulignant le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances ; cependant, le terme « essentiel » se comprenant comme le caractère principal de la plante (**Bernard et col, 1988**) .

Selon les normes AFNOR : « les huiles essentielles sont des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par hydrodistillation ou par entraînement à la vapeur d'eau » (**Othmer ,1983**) .

En industrie agro alimentaire, les huiles essentielles sont des matières grasses, liquides à température ordinaire, extraites des végétaux (olive, colza, arachide...) et utilisées en cuisine pour les sauces et les fritures (**Clement,1981**)

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles, dans des poils sécréteurs, dans des poches sécrétrices ou dans des canaux sécréteurs (**Bruneton, 1999; Hazzit, 2002; Boz et al, 2009**). Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs, les feuilles, les racines, les rhizomes, les fruits, le bois et/ou les graines (**Bruneton, 1993; Anton et Lobstein, 2005**).

II.2.3. Production mondiale des huiles essentielles :

Plusieurs pays tirent une grande partie de leurs ressources de l'exploitation des plantes A huiles essentielles. On estime aujourd'hui à environ 40 000 le nombre d'espèces aromatiques croissant dans le monde dont 3 000 ont été étudiées et 300 sont exploitées industriellement (**Souza et al,2006**). Plus de 90 % des espèces à étudier et à valoriser poussent dans les pays tropicaux (**Ouamba, 1991**). Les principales huiles essentielles produites et les principaux pays producteurs sont résumés dans le **tableau02**.

Tableau02: Récapitulation des principales huiles essentielles produites et des principaux pays producteurs dans le monde en 2008 (**Perfumer et Flavorist, 2009**).

Huiles essentielles	Production (Tonnes)	Principaux pays producteurs
Huiles d'oranges	51000	USA, Brésil, Argentine
Huiles du citron	9200	Argentine, Italie, Espagne
Huiles de l'eucalyptus	4000	Chine, Inde, Australie, Afrique du Sud

Huile de la menthe poivrée	3300	Inde, USA, Chine
Huile du clou de girofle	1800	Indonésie, Madagascar
Essence de la citronnelle	1800	Chine, Sri Lanka
Huiles de la menthe verte	1800	USA, Chine
Huiles du bois de cèdre	1650	USA, Chine
Huile de la lavande	1100	France

II.2.4. Localisation des huiles essentielles dans la plante :

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles sont alors stockées dans tous les organes végétaux (fleurs, feuille). Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de ce dernier peut varier selon la localisation (**Bruneton, 1999**). Dans certaines plantes, l'essence est produite par des tissus sécréteurs. Dans d'autres, elle se trouve en liaison glucosidique à l'intérieur des tissus et ne se manifeste que lorsqu'on froisse, écrase, sèche ou distille la plante. (**Schauemberg et Paris, 2010**) Les essences sont sécrétées dans différentes parties variant selon la plante aromatique. Ce peuvent être de minuscules cellule épidermique dans les pétales de la rose ou des poils sécréteurs disposés à la périphérie des calices floraux, des feuilles et des tiges chez les labiées (thyme, sauge) ou de grosses cellules disposées au sein des tissus végétales : tiges, écorces, racines, feuilles, semences. (**Scimeca et Tétou, 2005**)

La synthèse des huiles essentielles peut s'effectuer dans des cavités, alvéoles ou poches ou canaux sécréteurs se situant soit à la périphérie du fruit, soit dans les tissus plus profonds des racines, des feuilles ou des tiges (**Perrin et Colsan, 1985**).

Le tableau 03 donne des exemples de plantes et leurs parties riches en huiles essentielles (**Ntezurubanza, 2000**).

Tableau 03 : Les parties de certaines plantes riches en huiles essentielles (**Ntezurubanza, 2000**).

Partie de plante	Exemple de plante
Feuilles	Romarin, sauge, eucalyptus, menthe, thym
Feuilles de confères	Sapin, cèdre
Tiges	Citronnelle, lemon-grass

Écorces	Cannelier
Racines	Angelica, vetiver
Rhizomes	Acorus, gingembre
Bulbes	Oignon
Bois	Santal, bois de rose
Fruits	Bleuet, citron, fenouil, anis
Fleurs	Jasmin, rose, oranger
Graines	Aneth, coriandre

II.2.5.Fonction des huiles essentielles :

La fonction biologique des terpenoides des huiles essentielles demeure le plus souvent obscure.

Il est toutefois vraisemblable qu'ils ont un rôle écologique, le rôle de certains d'entre eux a été établi expérimentalement aussi bien dans domaine des interactions végétales (comme agent allélopathiques, notamment inhibiteurs de germination) que dans celui des interactions végétales animales : protection contre les prédateurs (insectes, champignons) et attraction des pollinisateurs (**Bruneton, 1993**).

II.2.6.Propriétés physiques :

Les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques, elles sont généralement des lipides à la température ordinaire, elles sont solubles dans les alcools, et dans la plus part des solvants organiques. (**Paris et Hurabielle, 1981**)

D'après **Padrini et Lucheroni (1997)**, les huiles essentielles sont divisées en quatre classes, suivant leurs couleurs:

- Les H.E. incolores.
- Les H.E. jaunes.
- Les H.E. bleues.
- Les H.E. vertes brunes ou jaunes verts.
- Leur point d'ébullition varie de 160°C à 240°C.
- Leur densité est inférieure à celle de l'eau, varie de 0,75 à 0,99.
- Elles ont un indice de réfraction élevé.
- Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation, elles sont donc de conservation limitée.
- Dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels.

(Legrand, 1978)

II.2.7.Composition chimique :

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable (**Belaiche, 1979**). A côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces (**Pibiri, 2006**). Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes :

- ❖ le groupe de terpénoïdes ;
- ❖ le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

D'après **Pibiri (2006)**, la structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés.

Selon **Mailhebiau (1994)**, cette structure varie en fonction :

Du nombre d'atomes de carbone qui les constitue :

- Les monoterpènes ;
- Les sesquiterpènes ;
- Rarement les diterpènes.
 - Du caractère saturé ou insaturé des liaisons
 - De leur agencement : linéaire ou cyclique ;
 - De la configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...) ; De la nature des groupes fonctionnels à savoir :
- Terpènes : $R_1-HC=CH-R_2$;
- Alcools terpéniques : $R-OH$;
- Cétones : R_1-CO-R_2 ;
- Phénols : C_6H_6-OH ;
- Aldéhydes : $R-CHO$;
- Esters : $R_1-COO-R_2$;
- Ethers : R_1-O-R_2 .

II.2.8.Facteur de variation de la composition des H.E :

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité est fondamentale car les activités biologiques qui découlent des huiles essentielles peuvent être très différentes. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante (**Garnéro, 1991; Bruneton, 1999**).

II.2.8.1.Facteurs intrinsèques :

Une huile essentielle doit avant tout autre chose être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal (**Bruneton, 1999**).

L'influence du stade végétatif (**Garnéro, 1991; Bruneton, 1999;**), l'organe de la plante (**Maffei et Sacco, 1987 ; Barry, 2001 ; Choudhury et al., 1998**), les hybridations, les facteurs de mutation, la polyploïdie (**Garnéro, 1991**) et le polymorphisme chimique « chimio types ou formes physiologiques » (**Garnéro, 1991; Anton et Lobstein, 2005; Belyagoubi, 2006**) sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles.

II.2.8.2.Facteurs extrinsèques :

Les conditions environnementales influencent aussi la composition des huiles essentielles. La température, la quantité de lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée (**Bruneton, 1999**). Il n'y a pas eu mal des travaux ayant mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (**Barry, 2001; Mohammedi, 2006**), Les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (**Barry, 2001; Lahlou, 2004**).

L'instabilité des constituants des huiles essentielles explique que la composition du produit obtenu par hydro distillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Au cours de l'hydro distillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire

l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations, etc. (Silou, 2003; Lucchesi, 2005).

La méthode d'extraction (Huanget al., 1987; Bruneton, 1999) et l'état du matériel végétal influent aussi sur la composition et le rendement des huiles essentielles. Il faut aussi signaler que le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles (Besombes, 2008).

II.2.9.Toxicité des huiles essentielles :

Certaines essences peuvent présenter un risque de toxicité si elles sont utilisées en quantité élevée. Paracelse a dit : « Rien n'est toxique, tout est toxique, c'est une question de dose ». (Engebin, 2011). Pour les plantes, les huiles essentielles sont très concentrées en éléments chimiques actifs et peuvent présenter certains dangers. Plusieurs hémotypes sont agressifs ou allergènes pour la peau, d'autre peut être toxique a fort dose ou sur une longue période, il faut savoir que certain hémotypes comme les cétones, sont des poisons et ne doivent jamais être que absorbées (Valnet, 1984).

La toxicité immédiate par les huiles essentielles est mieux connue. Parmi ces intoxications, selon (Bruneton, 1999), on a :

- L'essence de sobine induit des hémorragies utérines chez la femme.
- L'essence de genévrier donne les hématuries chez l'homme.
- Une dose de 2 g de menthol peut induit un spasme de la glotte qui mène a une asphyxie.
- Cis anéthol provoque des convulsions.
- Le carva col comme le thymol est irritant, astringent et caustique, ingéré a la dose de 2 g, il provoque un peu de gastralgie avec nausées, a plus fortes doses, il détermine la diarrhée.
- On connaît aussi la neurotoxicité des huiles essentielles à thyonés ou à pinocamphone : ces huiles induisent des crises épileptiformes et tétaniformes, des troubles psychiques et sensoriels nécessitant l'hospitalisation.

II.2.10.Méthode d'extraction des huiles essentielles :

Différentes méthodes sont mises en oeuvre pour l'extraction des essences végétales. En général, le choix de la méthode d'extraction des huiles essentielles dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), le rendement en huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (Hellal, 2010).

II.2.10.1 .Extraction par Hydro distillation des huiles essentielles :

Le principe de l'hydro-distillation consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau (aujourd'hui remplacé par un Clevenger), que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. La pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et son appareillage n'est pas coûteux (Lucchesi, 2005).

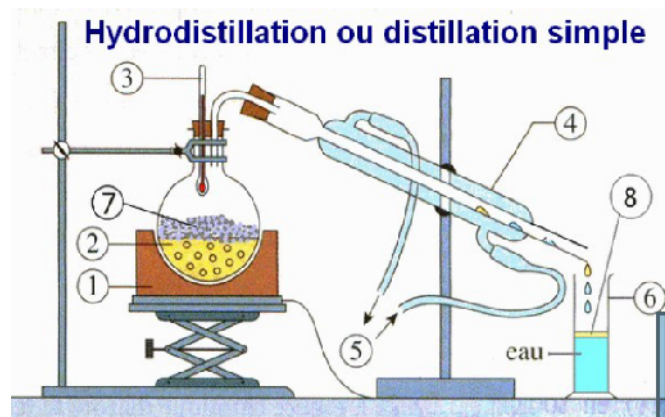


Figure 01: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005).

- | | |
|--------------------|----------------------------------|
| 1. Chauffe ballon. | 5. Entrée et sortie d'eau. |
| 2. Ballon. | 6. Erlenmeyer. |
| 3. Thermomètre. | 7. Matière à extraire l'essence. |
| 4. Réfrigérant. | 8. La couche d'HE. |

II.2.10.2 .Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Le matériel végétal est placé sur une grille perforée à travers laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques (Hellal, 2010).

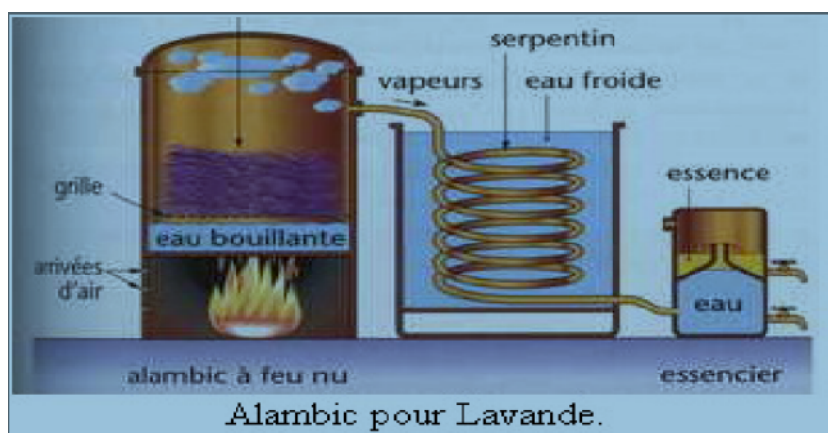


Figure 02: Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur (lucchesi, 2005).

II.2.10.3.Expression à froid :

Cette technique d'extraction est utilisée pour l'obtention des essences d'agrumes ou hespéridés : bergamote, citron, mandarine, etc. L'huile essentielle est contenue dans le zeste, partie superficielle de l'écorce de ces fruits. Autrefois, la méthode dite « à l'écuelle » consistait à frotter le fruit, manuellement, dans un bol en bois dont l'intérieur était garni de picots. Le jus était recueilli à l'aide d'une éponge - exprimé dans un récipient- puis filtré. Actuellement, les fruits sont compressés à

froid ; l'huile essentielle et le jus recueillis sont séparés par centrifugation. Cette méthode rapide et efficace donne une essence de bonne qualité (Beneteaud, 2011).

II.2.10.4.Extraction par solvants organiques :

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol moins

fréquemment le dichlorométhane et l'acétone. (Legrand, 1993 ; Dapkevicius *et al*, 1998 ; Kim et Lee, 2002)

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient (AFNOR, 2000) :

- Des hydrolysats : extraction par solvant en présence d'eau
- Des alcoolats : extraction avec de l'éthanol dilués traités par l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau.
- De résinoïdes ou extraits éthanoliques concentrés

L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement. (Rivera, 2006)

II. 2.10.5. Extraction par CO₂ supercritique :

Le CO₂ permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux. Il est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal. Après le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (Chemat, 2009).

II.2. 11. Méthodes de caractérisation des Hs .Es:

La détermination de la composition chimique des H.Es est une étape importante malgré le développement des méthodes de séparation et d'identification. Elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques.

II.2.11.1. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG):

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs ont contribué à rendre la CPG incontournable pour la caractérisation des H.Es, le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules: un injecteur, une colonne

capillaire dans le four et un détecteur. Le mode d'injection le plus répandu est l'injection en split ou injection avec division de flux, il est utilisé pour l'analyse de solutions concentrées. L'injection se fait à haute température. L'échantillon est rapidement introduit dans l'injecteur

ou il est instantanément vaporisé et le mélange au gaz vecteur (hélium, azote, argon, ou hydrogène). Une électrovanne permet de régler le débit de fuite. ce procédé permet de faire en sorte qu'une fraction importante du flux gazeux soit évacuée, diminuant ainsi la quantité d'échantillon qui pénètre dans la colonne et évitant de saturer la phase stationnaire **(Bouchonnet & Libong, 2002)**.

Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaires est polaires, de leur volatilité si cette dernière est apolaire. Leurs différences de propriétés physicochimiques leurs confèrent des vitesses d'élution et ils sont donc séparés en fonctions du temps. Ils arrivent à l'extrémité de la colonne, ils sont alors détectés et enregistrés. La chromatographie en phase gazeuse permet donc de séparer un mélange gazeux complexe par succession continue d'équilibre entre phase mobile gazeuse et phase stationnaire **(Besombes, 2008)**.

Le développement des phases stationnaires et de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés rencontrées dans la séparation et l'identification des composes dans les H.Es. Ainsi, la CPG bidimensionnelles (CPG/CPG), mettant en ligne deux colonnes capillaires, permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant co-éluer avec les composes plus abondants. L'échantillon est injecté dans la première colonne, puis les composés qui co-éluent sont transférés dans une deuxième

colonne pour être séparés **(Paolini, 2005)**.

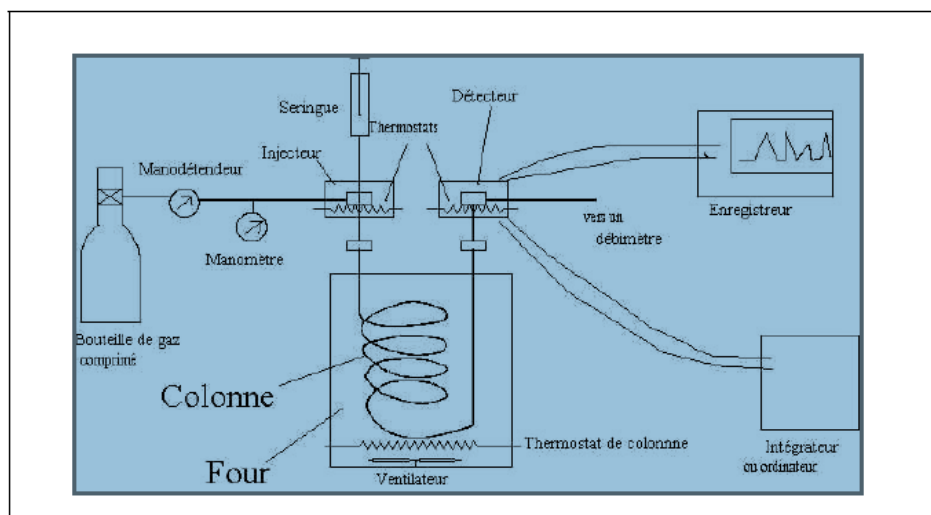


Figure 03: Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse **(Besombes, 2008)**.

II.2.11.2. La spectrométrie de masse (SM):

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des composés. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse; tous ont communs trois éléments: Une source, un analyseur et un détecteur. La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites. En couplage avec le chromatographe en phase gazeuse. Ou les composés sont élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux, les sources utilisées sont dites à ionisation électronique (IE) ou à ionisation chimique (IC). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250°C) pour éviter la condensation des substances (**Bouchennet & Libong, 2002**). Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil dans le spectromètre de masse, les ions sont séparés selon leur rapport (masse/charge) à l'aide d'un champ magnétique ou électrique (**Besombes, 2008**). Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse est détecté et transformé en un signal utilisable.

II.11.3 .Couplage CPG/SM:

Le couplage chromatographie en phase gazeuse spectrométrie de masse est aujourd'hui une des techniques parmi les plus utilisées de la chimie analytique. L'association des deux techniques fournit un instrument d'analyse particulièrement performant.

La principale difficulté rencontrée lors de ce couplage est due à la grande différence de pression. En effet, la spectrométrie de masse requiert un niveau de pression très bas, alors que la chromatographie en phase gazeuse se déroule à un niveau de pression plus élevé. Ainsi le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des H.Es (**Cavalli, 2002**). Le bombardement de substances par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 70eV provoque leur ionisation et leur fragmentation les fragments ioniques positifs forment alors le spectre de masse caractéristique du composé. Les spectres de masse ainsi obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées contenant plusieurs milliers de spectres (**Bouchennet & Libong, 2002**).

II.2.12.Utilisation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont utilisées dans plusieurs domaines d'industrie, l'industrie du Parfum est le débouché principal de cette dernière. La cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs.

Certaines huiles essentielles sont aussi utilisées dans l'industrie pharmaceutique, en particulier dans le domaine des antiseptiques externes et plus généralement pour l'aromatisation des formes médicamenteuses destinées à être administrées par voie orale. Les huiles essentielles trouvent également des applications dans diverses industries agro alimentaires et les industries chimiques **(Bruneton, 1993)**

II.2.13. Conservation des huiles essentielles :

La conservation des huiles essentielles est difficile, ceci est dû à l'instabilité de leurs molécules. De ce fait, les possibilités de dégradation sont nombreuses. Il est possible de limiter celles-ci en utilisant des flacons de faible volume en aluminium, en acier inoxydable ou en verre brun, entièrement remplis et fermés de façon étanche, stockés à basse température, ou conservés sous atmosphère d'azote **(Bruneton, 1993)**.

A cause de leur évaporation rapide, leur sensibilité à l'air et à la lumière, les huiles essentielles doivent être conservées dans des flacons opaques et fermés hermétiquement **(Valnet, 1984 ; Salle et Pelletier, 1991)**.

II.3.1. Activité antioxydant des huiles essentielles:

L'activité antioxydant d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés anti oxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\bullet$) et superoxydes ($\text{O}_2\bullet$) (Rice-Evans et al, 1995; Bartosz et al, 2003).

II.3.2. les méthodes des Evaluation de l'activité antioxydante:

II.3.2.1. Blanchissement de la bêta-carotène: β -carotène bleaching method

Cette technique spectrophotométrique consiste à mesurer la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. L'oxydation de ce dernier génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β - carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (Tepe et al. 2006).

II.3.2.2. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH \bullet) :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure activité antioxydante des composés phénoliques (Medjoujda et Benlifa, 2014). La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence des composés phénoliques. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie .Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques (Molyneuxs, 2004).

II.3.2.3. La méthode TEAC :

La méthode TEAC est un test de décoloration basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical-cation ABTS⁺, le 2,2 azinobis (acide 3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (**Pellegrini et al, 2003**). Cette méthode détermine l'activité antioxydante des composés hydrophiles et lipophiles qui peuvent se dissoudre dans une solution aqueuse ou de l'éthanol acidifié (**Sánchez-Moreno, 2002**). La valeur TEAC correspond à la concentration (mmol/l ou mg/l) de Trolox (l'analogue hydrophile de la vitamine E) ayant la même activité que la concentration unitaire du composé à tester (**Marc et al, 2004**). Cette méthode a été employée dans de nombreux laboratoires en raison de sa simplicité, de sa rapidité et de sa corrélation avec l'activité biologique des antioxydants. Les principaux inconvénients de la méthode TEAC sont les suivantes: le radical-cation ABTS⁺ doit être généré à partir des sels ABTS, les radicaux libres générés ne sont pas stables durant de longues périodes et il est difficile de comparer les valeurs à d'autres études parce que la technique n'est pas standardisée (**Sánchez-Moreno, 2002**). Il est préférable d'utiliser cette méthode pour fournir un ordre de classement aux antioxydants à l'étude (**Phipps et al., 2007; Prior et al., 2005**).

II.3.2.4. La méthode TRAP :

La méthode TRAP est basée sur la capacité d'un antioxydant à inhiber l'action des radicaux peroxydes. Les radicaux sont générés par les sondes fluorescentes telles que le BAP [2,2 -azo-bis (2-amidinopropane) chlorhydrate] ou AAPH [2,2'-azo -bis (2- amidinopropane) dichlorhydrate]. Les avantages de cette méthode sont que les antioxydants non enzymatiques (glutathion, acide ascorbique, alpha-tocophérol et le bêta-carotène) peuvent être quantifiés et la capacité antioxydante du plasma et du sérum sanguin peut être mesurée (**Phipps et al., 2007**) Le principal inconvénient est que les temps de latence, le délai entre une action et le début d'une réaction, ne sont pas toujours respectés; il est alors difficile de comparer les résultats avec d'autres études. Les antioxydants n'ont pas tous une phase de latence détectable cependant, l'utilisation de cette technique est basée sur l'hypothèse que tous les antioxydants démontrent une phase de latence et que la durée de cette phase est proportionnelle à la capacité antioxydante (**Prior, 2005**).

II.3.2.5. La méthode FRAP :

La méthode FRAP, un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, évalue la réduction du fer (le passage de la forme ferrique à ferreux) en présence d'un antioxydant **(Pellegrini et al, 2003)**. Une molécule change de couleur une fois qu'elle est réduite, ce qui permet la quantification par spectrophotométrie. Les avantages de cette méthode sont qu'elle est simple, rapide, peu coûteuse et robuste. En revanche, les désavantages sont qu'elle n'est pas capable de détecter les protéines ou les composés contenant le group SH, incluant les thiols, qui peuvent transférer l'hydrogène. Pour cette raison, le test FRAP sous-estime souvent l'activité antioxydante du sérum sanguin **(Phipps, et al, 2007; Prior et al, 2005)**.

II.4.1. Introduction:

Dès la naissance l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutané-muqueux. Pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (**Kaufmann, 1997**).

II.4.2. Les principales substances antimicrobiennes:

a. Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (**Bergogne-Berezin et Dellamonica., 1995**).

La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments (**Billing et Sherman., 1998**).

b. Les huiles essentielles :

Produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles sont toujours utilisées comme substances aromatisantes et parfumantes en parfumerie, industries alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire, en aromathérapie et en industrie alimentaire (**Baudoux, 2000**). Différentes études récentes ont confirmé, *in vitro*, l'activité antimicrobienne de diverses huiles essentielles (**Hili et al., 1997 ; Billing et Sherman, 1998**).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement fonction de leur composition chimique, en particulier de leurs composés volatils majeurs. En effet, l'activité

antimicrobienne remarquable de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est en relation avec sa teneur élevée en thymol (un composé phénolique) qui est réputé avoir une très grande action antimicrobienne (**Ettayebi et al., 2000 ; Ultee et al., 2000 ; Friedman et al., 2002 ; Chun et al., 2005**).

II.4.3. Les bactéries étudiées:

❖ *Escherichia coli*:

Escherichia coli est l'espèce type du genre *Escherichia* des entérobactéries. Appelée communément "colibacille" c.-à-d. "bacille à côlon", cette espèce qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études constitue le modèle des bacilles à Gram- aérobies. (**Joly et Reynaud., 2002**).

E. coli est une bactérie qui fait partie de la famille des *Entérobactéries*; germe que l'on trouve le plus communément; germe que l'on trouve le plus communément dans les intestins de l'homme et des animaux à sang chaud.

Le plus souvent les souches d'*E. coli* qui colonisent l'appareil gastro-intestinal sont des commensaux inoffensifs. Toutefois à l'intérieur de l'espèce on trouve au moins quatre types de souches pathogènes:

E. coli enteropathogène (EPEC); *E. coli* enterotoxinogène (ETEC); *E. coli* enteroinvasif (EIEC); *E. coli* de type de dysenterie à bacille de shiga, la dose infective est faible (100 bactéries vivantes); *E. coli* entérohémorragique (EHEC) et *E. coli* producteur de vérocytoscine (VTEC) ou *E.coli* O157 H:7 (**JOLY & REYNAUD, 2002**).

Les études épidémiologiques font appel à la stérotypie; la lysotipie; et aux méthodes génétiques pour distinguer les différents types d'*E. Coli*. Mais il ne nécessite pas de marques phénotypiques spécifiques permettant de séparer les souches non pathogènes.

Toutefois certaines propriétés atypiques telles que, le fait d'être lactose négative ou de ne pas produire d'indole à 44°C, sont plus répandues parmi les souches pathogènes. VTEC ne se développe pas du tout sur les milieux sélectifs à 44°C (**MANIL, 2004**). Les souches pathogènes d'*E. coli* sont responsable de maladies intestinales qui varient en gravité; des formes bénignes jusqu'à des formes grave même être mortelle (le syndrome est mortel dans 20 à 30% des cas).

➤ **Systematique:**

D'après Denis et al. (2007), la systématique d'*E. coli* est la suivante:

Règne : Bacteria.
Division : Proteobacteria.
Classe : Gammaproteobacteria.
Ordre : Enterobacteriales.
Famille : Enterobacteriaceae.
Genre : *Escherichia*.
Espèce : *Escherichia coli*.

❖ ***Staphylococcus aureus*:**

C'est un coque à Gram+ de 0,5 à 1 um de diamètre, non sporulé, immobile, aéro-anaérobie facultatif (Larpen, 1997), Les staphylocoques fait partie de la famille des *Micrococcaceae* sont des germes ubiquitaire que l'on trouve dans l'eau; l'air; les sols; les eaux usées etc. le principale réservoir et habitat est constituée par le nez, la gorge et la peau des animaux/humain. 60% de porteurs en bonne santé sont des porteurs avec une moyenne de 25-30% de la population positive à l'égard des souches productrices d'enterotoxines (Devriese et al, 2005). Les TIA causées par *S. aureus* sont très fréquent, se manifestent surtout en faveur d'une hygiène défectueuse. Les symptômes qui peuvent survenir dans les 2à4 heures qui suivent la consommation d'aliment contaminés sont les nausées, les vomissements et; parfois des diarrhées. Dans les cas graves la déshydratation peut conduire au choc et au collapsus.

La mortalité liées aux complications de *S. aureus* peuvent être considérables et atteindre 3-20%. Les produits de la mer peuvent être contaminés par les *staphylocoques* soit par l'intermédiaire de manipulateurs infectés; soit par l'environnement. Lorsqu'il se multiplie dans les aliments, *S aureus* produit un certain nombre d'enterotoxine.

Ces toxines sont très résistantes aux enzymes protéolytiques et à la chaleur (la chaleur appliquée à domicile ne suffit pas à détruire la toxine) (Vincenot et al., 2008). De bonnes pratiques sanitaires, ainsi le contrôle de la température sont nécessaires pour éviter la contamination; la prolifération et la production de toxines, notamment dans le cas des produits de la mer pré-cuits.

➤ **Systematique :**

D'après Denis et al.(2007) , la systématique de *S. aureus* est la suivante:

Règne : Bacteria .

Division : Firmicutes.

Classe : Bacili .

Ordre : Bacillales .

Famille : Staphylococcaceae.

Genre : *Staphylococcus*.

Espèce : *Staphlococcus aureus*

Matériels et Méthodes

III.1.Objectif du travail :

L'objectif de notre travail est la caractérisation physicochimique de l'huile essentielle du *Thymus vilgaris* L, collecté de la région de commune d'EL Mekhatria wilaya d'Ain defla).et l'étude de l'activité antibactérienne vis-à-vis deux souche bactériennes pathogènes (*E.coli* et *S. aureus*) et antioxydante .

Notre expérimentation s'est déroulée au niveau des laboratoires de chimie 02 et microbiologie de l'université de Djilali Bounaama Khemis Milana pendant une durée de trois mois

III.2.Présentation de la zone d'étude :

La commune d'EL Mekhatria , se situe à quelques kilomètres, au nord du chef-lieu de wilaya d'Ain defla.

Caractérisée par son climat froid en hiver et chaud en été. Limitée à l'ouest par la commune d'El Amra, à l'Est par la commune d'Arib, au sud par la commune de Ain Defla et par la wilaya de Tipaza au nord.



Figure 04: Photo de *vue* générale de localisation de région de cueillette (boukaaben) commune d'el mekhatria (photo personnelle)

III.3.Matériels utilisés :

III.3.1.matériels végétal :

Les échantillons de la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de *thymus vulgaris* ont été récoltés au mois Mars (2016) dans la région la commune d'El Mekhatria (boukaaben) de wilaya d'Ain Defla



Figure05 : Photo de *Thymus vulgaris* L (photo personnelle)

III.3.3. Identification botanique :

Cette plante a été identifiée au niveau du département des sciences agronomique, de la faculté sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre, l'université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, comme étant du *Thymus vulgaris* L.

III.3.4.séchage de partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de *Thymus vulgaris* :

Après la récolte la plante de *Thymus vulgaris* nous avons séchés la plante à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, dan un endroit bien aéré loin de l'humidité et de la poussière sur des journaux. Le séchage a duré 7 jours



Figure 06: Photo de *Thymus vulgaris sec* (photo personnelle)

III.3.5. Stockage des plantes séchées :

Les plantes de *Thymus vulgaris* séchées ont été conservées dans des sacs en plastique.

III.4. Matériel Biologique:

Les bactéries testées sont provenus du laboratoire Zibouche de Ain Defla. Toutes les bactéries sont regroupées dans le tableau ci dessous:

Tableau 04: Bactéries utilisés

Bactéries	Morphologie	N° ATCC	Gram	Famille
Escherichia coli	Bacille	25912	-	Enterobacteriaceae
Staphylococcus aureus	Coque	25923	+	Staphylococaceae

III.6. Méthodes :

III.6. 1. Détermination de la teneur en eau:

Les échantillons de la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de *thymus vulgaris L* sont sécher à 105° C jusqu'à la stabilisation du poids de la matière végétale.

L'expression de l'humidité est donnée par la relation suivante :

$$H(\%) = [m_0 - m_1 / m_0] \times 100$$

M₀ : poids de l'échantillon «avant étuvage».

M1 : poids de l'échantillon «après étuvage».

H(%) : Teneur en eau exprimé en pourcentage.

III.6.2. Détermination de la Matière sèche :

Après la détermination de la teneur en eau, nous avons calculé la teneur matière sèche

$$M_s = 100 - H \%$$

M_s : matière sèche exprimé en pourcentage.

H : Teneur en eau

III.2.3. Extraction d'huile essentielle :

➤ **Hydro distillation :**

Pour ce faire, un appareillage de type cléveinger a été utilisé.

L'appareil ou le montage de l'hydro distillation comprend essentiellement deux partie (ballon et réfrigérant).

- Le ballon à col redu : sert à contenir la matière végétale émergée dans l'eau distillée.
- Le réfrigérant : c'est un échangeur de la chaleur servant à convertir toute vapeur en liquide provenant du ballon

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- La masse de la matière végétale sèche : $m_s = 50$
- Le volume de l'eau distillé : $V_{ed} = 500$ ml
- Chauffage à la température d'ébullition d'eau.
- La période de récolte : Mars

La plante contenant l'huile essentielle est émergée dans un volume d'eau, le tout contenus dans un ballon et porté à l'ébullition. En s'évaporant, l'eau entraîne les composés volatiles des huiles essentielles.

Les vapeurs se condensent dans le réfrigérant a eau et s'écoule a l'état liquide dans un récipient ou elles forment le distillat qui va être composé de deux phases non nuisible : les huiles essentielles et l'eau.

L'huile extraite est récupérée dans des Eppendorf en plastique recouverts de papier aluminium pour évité la désintégration de l'huile, puis conservée.

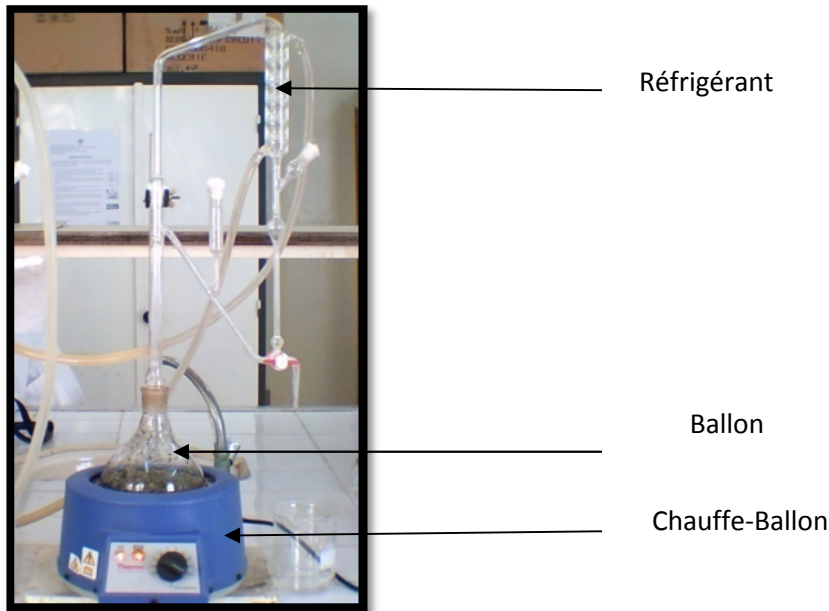


Figure07 : photo de appareil de l'hydro distillation (clevenger) (photo personnelle)

Nous avons effectuée plusieurs extractions successives en fonction du temps, puis nous avons calculé le rendement en huile essentielles de chaque extraction.

III.5.Calcul de rendement :

Le rendement en huile essentielle est définit comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traiter (AFNOR, 2000). Il est exprimé en pourcentage (%) suivant la formule ci-dessous :

$$R_{HE} (\%) = (M_{HE} / M_S) \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage.

M_{HE}: Masse d'huile essentielle récupérée et exprimée en gramme.

M_S : Masse de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction et exprimée en gramme.

Les huiles essentielles sont recueillies et conservées au réfrigérateur à 4°C dans des flacons sombres pour les préserver de la chaleur. Pour cela, une double pesée est réalisée :

- Première pesée : l'Eppendorf vide.
- Deuxième pesée : l'Eppendorf plein d'huile.

III.6.déterminations des caractères physiques :

III.6.1.Caractères organoleptiques :

a. L'odeur:

L'odorat est un sens chimique très sensible et l'habilité des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parvient à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'à dix millièmes de grammes par litre d'air.

b. La couleur:

La couleur de nos huiles est peut être déterminé à l'œil nu, sauf en présence d'une solution étalon, on peut l'utiliser pour évaluer le degré de ressemblance entre la couleur du produit étalon et celle de l'huile

c. L'aspect physique:

L'aspect d'une essence végétale change selon les produits qui la constituent, cette essence peut apparaître sous forme solide, liquide, ou semi-solide.

III.6.1.2. La densité relative :

La densité relative à 20° est le rapport de la masse d'un certain volume d'une huile sur essentielle, à la masse d'un volume égal d'eau distillé (AFNOR, 2000). A l'aide d'un pycnomètre, on effectue des pesées successives de volumes égaux d'huile essentielle et d'eau, à la température de 20°.

La densité relative est donnée par la formule suivante:

$$D = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)$$

- m_0 : la masse, en gramme du pycnomètre vide.
- m_1 : la masse, en gramme du pycnomètre, rempli de l'eau distillée.
- m_2 : la masse, en gramme du pycnomètre, remplie de l'huile.
- D : La valeur de la densité relative selon les normes.

III.6.1.3. L'indice de réfraction :

L'indice de réfraction est le rapport de la vitesse d'un rayon lumineux (la raie D du sodium 589 nm) dans le vide à sa vitesse dans le milieu. Autrement dit, c'est la mesure de la réfringence d'un corps donné par rapport à la raie D du sodium.

La mesure de l'indice de réfraction se fait par le biais d'un réfractomètre ABBE. Le réfractomètre est préalablement étalonné avec de l'eau distillée.

III.6.2.détermination des indice chimique :

III.6.2.1. Indice D'acide

Selon la norme **AFNOR (NF T75-103)**, L'indice d'acide d'une huile essentiel est nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentiel.

➤ Mode Opératoire :

- Peser 2 g d'huile essentiel de *thymus vulgaris* sont introduits dans un ballon
- Ajouter 5 ml d'éthanol neutralisé et 5 gouttes d'indicateur coloré (phénolphtaléine).
- Nous titrons par solution hydroxyde de potassium(KOH) 0.1 N contenus dans une burette
- poursuivre l'addition jusqu'à obtention du virage à l'incolore de la solution persistante pendant 30 s
- noter le volume (V) de la solution hydroxyde de potassium(KOH) utilisé.

L'indice d'acide (Ia) est mesuré par la formule :

$$\mathbf{Ia= V \times C \times (56.1/m).}$$

Ia: induce d'acide.

V: volume de la solution hydroxyde de potassium utilisée en titrage (ml).

C : concentration exacte de la solution hydroxyde de potassium(KOH) 0.1 M.

m: la masse de l'HE.

56.1 : poids moléculaire de KOH.

III.6.2.2.. Indice D'ester :

Selon la norme **AFNOR (NF T75-104)** l'indice d'ester est le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium(KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres par hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile essentielle.

➤ **Mode Opérateur :**

-Introduire 2 g d'huile essentielle de *thymus vulgaris* dans un ballon.

-Ajoute à l'aide d'une burette 25 ml de KOH (0.5 N).

-Prolonger l'ensemble dans un bain marie, chauffer jusqu'à ébullition pendant 30 mn. La fin de la réaction est déterminée lors de l'obtention d'une solution transparente et homogène (absence de trace de l'huile).

-Après refroidissement, ajouter 5 gouttes de solution de phénolphtaléine.

-titrer l'excès de la solution d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique (HCL 0.5 N).

-On effectue l'essai à blanc (même mode opératoire sans huile).

L'indice d'ester (I_e) est donné par la formule :

$$I_e = [28,05/m (v_0 - v_1)] - I_a$$

V_1 : volume en (ml) de HCL utilisé pour l'essai

V_0 : volume en (ml) de HCL utilisé pour l'essai à blanc.

M : masse en (g) de la prise d'essai de l'HE

I_a : Indice d'acide.

III.6.2.3. Indice de saponification I_s :

Selon la norme **AFNOR (NF T75-105)** l'indice de saponification correspond à la masse de potasse (KOH) en mg nécessaire pour saponifier les esters d'acides gras et neutraliser les acides gras non estérifiés dans un gramme d'huile essentielle. L'indice de saponification est donc une mesure indirecte de la masse molaire des acides gras.

➤ **Mode opératoire :**

- **Préparation du corps gras :**

les corps gras étant insolubles dans l'eau, il faut les dissoudre dans un solvant .

- Commencer par peser une masse de 4g d'HE dans un bécher.
- Ajouter 100 ml de solvant constitué d'éthanol et d'oxyde d'éthyle dans des proportions de volume à volume.
- Agiter pour dissoudre le corps gras (HE).
- **Dosage de l'indice de saponification :**
 - Introduire dans un bécher 10ml de solution de corps gras.
 - ajouter 25ml de potasse alcoolique de concentration 0,5 mol/l.
 - Mettre au bain marie bouillant pendant 60 minutes.
 - Ajouter 2 à 3 gouttes de phénophtaléine.
 - Doser l'excès de potasse par l'acide chlorhydrique de concentration 0,5 mol /l en agitant constamment jusqu'au virage à l'incolore de la phénophtaléine, faire deux essais.
- **Réalisation des témoins :**

Comme la concentration de la potasse alcoolique n'est pas exactement connue, il est nécessaire de la détermination par un témoin.

- Introduire dans un bécher 25ml de potasse alcoolique et 10ml de solvant.
- Traiter dans les mêmes conditions opératoires que les essais (bain marie) pendant 60 minutes.
- Ajouter 2 à 3 gouttes de phénophtaléine.
- Doser jusqu'au virage à l'incolore de la phénophtaléine.
- **Effectuer le calcul de l'indice de saponification par la formule suivante :**

$$I_s = [(v_t - v_e) \times C_{HCl} \times M_{KOH}] / m$$

V_T : volume versé témoin (l)

V_E : volume de d'essai (l)

M_{KOH} : Masse molaire du KOH (g /mol).

m: masse d'HE exactement pesée (g).

I_s : l'indice de saponification

III.6.2.4. Détermination du pH :

pH l'abréviation de potentiel d'hydrogène mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H^+) (appelés aussi couramment protons) en solution. Plus couramment, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Il s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre : elle est acide si son pH est inférieur à 7, neutre s'il est égal à 7, basique s'il est supérieur à 7

- **Étalonnage :**

Le pH-mètre est étalonné avant chaque campagne de mesures (par exemple tous les matins) avec deux solutions tampon. Selon les mesures à effectuer, on étalonne par exemple par une solution de pH=7 puis par une solution de pH=4 pour faire des mesures en milieu acide, ou par une solution de pH=7 puis une solution de pH=10 pour des mesures en milieu basique. Les valeurs des mesures sont idéalement comprises entre les deux valeurs de pH des solutions tampon utilisées (les valeurs de pH=4, 7 et 10 sont les plus communément rencontrées parmi les solutions tampon).

III.7. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

La CPG s'est montrée une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une HE, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative (**Pariset Godon, 1979**).

L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de produit analysé entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (**Skoog et al., 2003**).

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé (**Tranchât, 1995**)

III.8. L'activité antioxydante :

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *thymus vulgaris* de la région de la commune el mekhatria a été évaluée par la méthode de réduction de DPPH• en le comparant par l'acide ascorbique comme antioxydant de référence.

- **Mode Opérateur :**

-16 mg d'HE de *thymus vulgaris* ont été mélangés avec 16 ml de la solution d'éthanol (solution 1).

-0.24 mg DPPH• ont été mélangés avec 16 ml de la solution d'éthanol (solution 2).

-0.24 mg de l'acide ascorbique été mélangés avec 16 ml de la solution d'éthanol (solution 3).

-dans des tubes à essai secs. Mélange 2ml de solution (2) avec des différentes volumes de solution 1.

-Après 30min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, le colorimétrique change (de violet intense au jaune clair). quand le DPPH est réduit, dont l'absorbance a été mesurée à 517nm.

-Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'absorbance de l'acide ascorbique est mesurée dans les mêmes conditions que celle de l'huile essentielle.

-L'activité antioxydante est exprimée par le pouvoir de réduction (PR) de la solution d'éthanol de DPPH•. Le pouvoir de réduction est déterminé en appliquant la formule suivante :

$$\text{PR}\% = (\text{AC} - \text{AE}/\text{AC}) * 100$$

AE : absorbance de la solution de DPPH• en présence de HE ou de la vitamine C;

AC : absorbance de la solution de DPPH• en absence d'HE et de la vitamine C.

La variation du pouvoir de réduction en fonction de la concentration de l'HE et de la vitamine C, nous permet de calculer la Concentration Efficace CE50 (la concentration de l'HE (ou de la vitamine C) nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel). Plus la valeur de CE50 est basse, plus l'activité antioxydante est élevée, et vice versa E.Portes(2008).

III.9. évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne

Pour la mise en évidence *in vitro* du pouvoir antimicrobienne des huiles nous avons testés deux souches bactériennes, Les testes microbiologiques ont été réalisés au laboratoire de microbiologie de l'université de Khemis Miliana.

III.9.1.Obtention des suspensions bactériennes

Les souches ont été identifiées aux laboratoires et, utilisées comme souches de références pour des études préliminaires de sensibilité vis-à-vis des différentes huiles, Les différentes souches bactériennes ont été repiquées dans des tubes de T.S.B de conservation (en piqûre centrale) puis incubées à 37°C. Après 24 h d'incubation, ces tubes sont conservés à la température de réfrigération (4°C). Dans le but de garder toujours la disponibilité des souches, chaque 15 jour, des opérations de repiquage sont réalisées.

-avant la réalisation des tests antibactérienne, deux repiquages sont effectués pour chaque souche:

-en premier lieu elles ont été inoculées dans tube de 5ml de T.S.B liquide et bien agitées puis incubées à 37 °C pendant 24h.

-le deuxième repiquage est effectué dans un flacon de 50ml de T.S.B et incubé à 37 °C pendant 24h.

III.9.2.La dilution et dénombrement:

-À partir de flacon de 50 ml de T.S.B (contient la souche de 24h): on prend 1ml (1000µl) et on le transfert aseptiquement dans un Eppendorf (pour chaque souche).

-On réalise une centrifugation en déposant les deux Eppendorf suivant une position symétrique.

-La centrifugeuse est réglée à 3000 tours/minutes pendant 5 minutes à 4°C.

-On obtient deux phases: la surnageant+précipitation (micro-organismes), comme le montre la figure ci-dessous



Figure 08: photo de Centrifugeuse (photo personnelle)

-À l'aide d'une seringue, on élimine la surnageant, puis on ajoute un millilitre d'eau peptone.

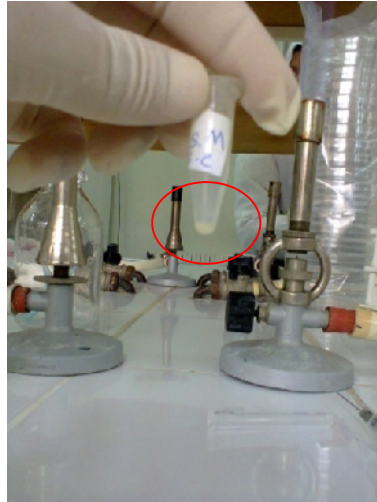


Figure09: photo de précipitation (micro-organismes) (photo personnelle).

-On fait l'agitation, puis la dilution (-1,-2,-3,-4,-5,-6) dans une série d'Eppendorf qui contient 900 μ l d'eau peptone à l'aide de micropipette de 100 μ l.

-À partir de dilution (-4.-5.-6), on fait l'ensemencement au profond des boites pétri de GN; puis on incube les boites à 37 °C pendant 24h.

III.9.3. Diffusion des disques sur gélose

- À l'aide des écouvillons on fait l'ensemencement de chaque bactérie à partir des flacons de 50ml dans des boites de pétri contenant le milieu gélosé Mueller Hinton.
- À l'aide d'une pince stérile prélever un disque stérile de 9mm l'imbiber avec 20 μ l de l'huile essentielle en thymus vulgaris L seulement le bout de disque en contact avec cette dernière.
- Celui-ci va absorber progressivement jusqu'à son imprégnation totale.
- Déposer le disque sur la surface de la gélose délicatement.
- Laisser diffuser sur la paillasse 30min. et Incuber à 37°C pendant 24h

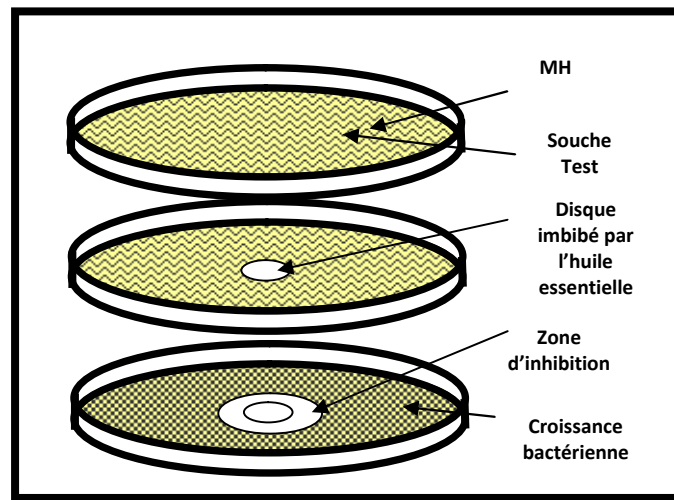


Figure10 : Illustration de la méthode de diffusion en gélose.

Résultats et discussions

IV.1.Détermination du teneur en eau et en matière sèche :

La teneur en eau de la matière végétale est de 10% et La teneur en matière sèche 90%

IV.2.Le rendement :

Le rendement d'huile essentielle de *thymus* 01%. Cette valeur est faible comparées à autre espèces de *thymus*

Selon Abid et al, (2008), ont montré que 70% du rendement global de l'huile essentielle par hydro distillation est obtenus dans les 18 premières minutes.

La variation dans le rendement peut être attribuée non seulement à l'origine de la plante, à la technique d'extraction utilisée mais également à la période de cueillette de la matière végétale (Fellah et al, 2006)

Selon une étude réalisée par Saidj (2006), les observations par microscope photonique ont montré que les feuilles et les tiges du *thym* contiennent des poils glandulaires exogènes se présentant sur les deux faces de la feuille et sur la surface de la tige, ces poils sont composés de cellules produisant des huiles essentielles.

IV.3.Caractérisation de l'huile essentielle de *thymus vulgaris L*:

IV.3.1.Propriétés organoleptique :

Les caractéristiques organoleptiques des HE extraites à partir partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de *thymus vulgaris* sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 05 : caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de *thymus vulgaris*

Caractéristiques	Normes (Afnor,2000)	Résultats obtenus
Aspect	Liquide mobile et limpide	Liquide
Couleur	Jaune à brun rouge	Jaune clair
odeur	Epicée rappelant celle du thymol	Epicée

L'analyse du tableau 05 révèle que les caractéristiques organoleptiques de nos huiles essentielles sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes A.F.N.O.R (2000).

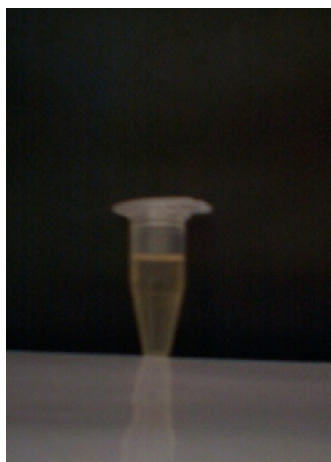


Figure 11 : photo d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (photo personnelle)

IV.3.2.caractères physico-chimiques des huiles essentielles de thymus vulgaris :

Tableau 06 : caractères physico-chimiques des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*

caractères physico-chimiques	Résultats obtenus	Normes (A.F.N.O.R)
L'indice de réfraction	1,501	1 ,4910 à 1,5100 (AFNOR, 1989)
Densité relative	0,89	0,905 à 0,950 (AFNOR, 1989)
Indice D'ester	4,59	49,5 à 52,55 (AFNOR, 1996)
Indice D'acide	4,7685	4,1 à 5,1 (AFNOR, 1996)
Indice de saponification	0,0336	/
pH	6,16	/

- La densité relative de nos huiles essentielles de thymus vulgaris (d'acheter de marché de la wilaya d'Ain defla) est de 0.89, donc elles sont plus légères que l'eau, et dans la norme d'A.F.N.O.R
- L'indice de réfraction de l'huile essentielle de thymus vulgaris est élevé, il est supérieur à celui de l'eau à 20°C(1.3356) et dans les normes

d'A.F.N.O.R, cela dévoile leur richesse en composants qui dévient la lumière polarisée.

- L'indice d'acide est un paramètre qui renseigne sur le taux d'acides gras libre existant dans une huile essentielle, sa valeur obtenue est de 4.7685 mg KOH/g de corps gras signifie que notre huile essentielle possède un taux d'oxydation élevé ce qui provoque une dégradation rapide des huiles essentielles.
- l'indice de saponification est de 0.0336, cela explique que notre huile essentielle est peu saponifiable
- Le pH que nous avons trouvé (pH = 6.16) indique que notre huile essentielle de *Thymus vulgaris* est un acide.

IV.4.L'analyse par CPG de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* :

Tableau 07 : Principaux Composés en % de l'huile essentielle de *Thymus. Vulgaris*

Nom des composés	Pourcentage (%)
<i>α-thujène</i>	1,50 %
<i>α-pinène</i>	1,31 %
<i>camphène</i>	0,11 %
<i>Sabinène</i>	0,27 %
<i>β-pinène</i>	0,17 %
<i>Myrcene</i>	1,75 %
<i>α-phellarene</i>	0,24 %
<i>carène</i>	0,10 %
<i>α-terpinène</i>	1,93 %
<i>P.Cymène</i>	5,65 %
<i>limonène</i>	0,54 %
<i>gamma- terpinène</i>	20,05 %
<i>linalol</i>	5,25 %
<i>Bornéol</i>	0,26 %
<i>Menthol</i>	0,30 %
<i>Thymol</i>	0,56 %

Carvacrol	54,5 %
B.Caryophellene	0,09 %

L'analyse de l'huile essentielle de la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de *Thymus vulgaris* par chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier 18 composés, représentant 94,58 % de l'extrait. Les composés majoritaires sont : *Carvacrol* (54.5 %) , *gamma-terpinène* (20.05 %) , *P.Cymène* (5.65 %) et *linalol* (5.25 %).

IV.5.L'activité antioxydante :

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres, donc cette méthode est basée sur la réduction d'une solution éthanolique de DPPH en présence d'un antioxydant, ce radical libre présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piégé par les substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle , le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire.

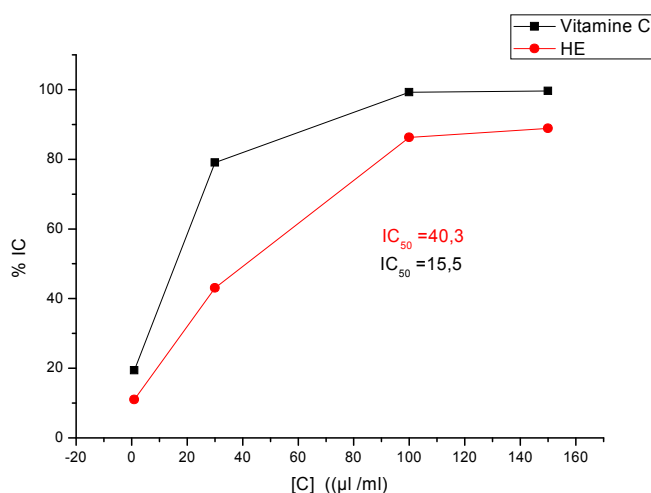


Figure 11: Evolution de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration.

La figure ci-dessous montre les résultats de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH• en fonction de concentration des composés testés. Ils

montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour l'acide ascorbique et des extraits de notre espèce, On observe que le pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique est supérieur à celui de l'extrait.

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *thymus vulgaris* de la région de Mekhatria a été évaluée par la méthode de réduction de DPPH• en le comparant par l'acide ascorbique comme antioxydant de référence, malgré que l'utilisation d'une seule méthode ne puisse donner qu'une suggestion réduite de l'activité antioxydante. Cette méthode est simple mais fortement sensible et plus utilisée.

Dans la présente étude, l'huile essentielle de *thymus vulgaris* et la vitamine C ont pu réduire le radical libre DPPH•. Les valeurs de CE50 sont calculées, en vue de déterminer les concentrations qui réduisent 50% des radicaux libres. Cette huile a montré une bonne capacité antioxydante comparant à la vitamine C. Le meilleur CE50 (40.3 µl/ml) est attribué à l'huile essentielle qui a été capable de réduire le radical stable DPPH traduit par le changement de couleur de violet au jaune par contre un CE50 égale à (15.5 µl/ml)

IV.6.L'activité antibactérienne:

Les diamètres des zones d'inhibition résultants ont été mesurés en mm incluant le diamètre du disque de papier (9 mm). Les tests ont été effectués en duplicata. Les résultats sont exprimés en moyenne de trois déterminations (+/-) écart type.

La sensibilité des bactéries cibles envers les différents composés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition (**ponce et al, 2003**):

- ❖ $\emptyset < 9$ millimètre (mm): bactérie non sensible(-) ;
- ❖ $9 < \emptyset < 14$ mm: bactérie sensible(+);
- ❖ $15 < \emptyset < 19$ mm: bactérie très sensible (++);
- ❖ $\emptyset > 20$ mm: bactérie extrêmement sensible (+++).



Figure 13 : Photos montrant l'effet de huile essentielle pure de *Thymus vulgaris.L* sur *Staphylococcus aureus* et *E-coli* (photo personnelle)

Tableau 08: valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition

Nom de la souche	Gram	Diamètre moyans de la zone d'inhibition (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	40
<i>Escherichia coli</i>	-	37

Les résultantes obtenus montre que l'huile essentielle de thymus vulgaris pure possède un large spectre d'activité antibactérienne sur les bactéries gram+ (*Staphylococcus aureus*) que les gram- (*E-coli*)

D'après **Kalemba et kunicka (2003)**, la sensibilité d'un microorganismes aux HEs dépend des propriétés de L'HE et de microorganisme lui-meme. Il est bien connu que les bactéries à Gram positive sont plus sensible aux HEs que les bactéries à Gram négative. Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des HEs confirment ce phénomène (**Poole, 2001; Burt, 2004; Bekhechi et al., 2008**).

E. coli ATCC 25922 s'est avérée plus sensible, malgré qu'elle est Gram négatif. Il est postulé que les différents composants des huiles essentielles montrent différents degrés d'activité contre des bactéries G- et G+ (**Dorman et Deans, 2000**) et que la composition chimique des huiles essentielles peut varier selon plusieurs facteurs intrinsèque et extrinsèque (**Lahlou, 2004**). Il est connu aussi que les espèces bactériennes n'ont pas également la même sensibilité vis-à-vis d'un agent antibactérien. De même dans une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Ainsi, l'action antibactérienne est parfois partielle et après une diminution du nombre de bactéries, il y'a une reprise de la

Croissance bactérienne. (**Dorman et Deans,2000**)

L'activité antibactérienne peut dépendre aussi de la composition du culture (**Dorman et Deans, 2000**).

Selon **Gulfraz et al. (2008)**, l'activité antimicrobienne de toutes huiles essentielles est assignée aux terpénoïdes et aux composés phénoliques.

IV.6.1. Dénombrement bactérien:

Les résultats obtenus sont représenté dans le tableau ci-dessous:

Tableau 09 : Dénombrement bactérien

Les bactériens les dilutions	<i>E-coli</i>	<i>S. aureus</i>
10^{-4}	2.86×10^7 UFC	1.72×10^7 UFC
10^{-5}	1.9×10^8 UFC	1.36×10^8 UFC
10^{-6}	1×10^9 UFC	1.19×10^9 UFC

Conclusion

Après les méthodes pratiques on résume notre travail sur les points suivants :

- L'extraction de huile essentielle nous a optimisé un rendement 01 %, sachant qu'une durée de 2 heure d'extraction par hydrodistillateur à été suffisante pour l'épuisement de toutes les cellules sécrétrices, récupérer la totalité d'huile essentielle existante
- La détermination des caractères organoleptiques (aspect : liquide, couleur : Jaune clair, Odeur : Epicée)
- La détermination des caractères physico-chimiques (densité : 0,89, L'indice de réfraction : 1,501, pH : 6,16, Indice D'ester : 4,59, Indice D'acide : 4,7685, Indice de saponification 0.0336
- L'analyse CPG/SM de l'huile essentielle de la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de *thymus vulgaris L* par chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier 18 composés, représentant 94,58 % de l'extrait. Les composés majoritaires sont : *Carvacrol* (54,5 %), gamma-terpinène (20,05 %), P.Cymène (5,65 %) et *linalol* (5,25 %).
- L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *thymus vulgaris L* de la région de Mekhatria été évaluée par la méthode de réduction de DPPH• en le comparant par l'acide ascorbique comme antioxydant de référence, La coloration de solution DPPH éthanolique par l'huile de *thymus vulgaris L* confirme qu'il possède une activité antioxydante.
- Enfin les tests de l'activité antimicrobienne de ces essences ont montré l'effet inhibiteur sur les souches *Escherichia coli* (37mm), *staphylococcus aureus* (40mm). De la comparaison des diamètres d'inhibition, on constate que l'huile essentielle de *thymus vulgaris L* présente une activité antimicrobienne plus importante.

Références bibliographiques

AFNOR information, 2000 : Recueil des norme Françaises :huiles essentielles.(NF T75-103),(NF T75-104),(NF T75-105).

AFNOR, 1989 : les huiles essentielles 3^{ème} Ed Recueil des norms françaises,paris.

AFNOR, 2000) :Huiles essentielles, Monographies relatives aux huiles essentielles, Tome 2, 6ème édition, AFNOR, Paris.

Anthoula. A., 2003: La filière “Plantes Aromatiques & Médicinales” antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*.

Anton .R. et Lobstein .A., 2005 : Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc., Paris, 522p.

Atti .I., 2014 : Evaluation des activités antioxydant et antiradicalaire d’un mélange d’épices « Ras el hanout », Mémoire de Master,Université Kasdi Merbah Ouargla.

B

Bakkali F.,Averbeck S.,Averbeck. D .,2008 : Review MI-Biological effects of essential oils- A review food and chemical toxicology, vol. 46; pp 446-475.

Barry N., 2001 : Art d’extraire les huiles essentielles : de parfum à faire soi même. Ed. Tec. & doc. Lavoisier, paris, p. 125- 128.

Bartosz G., 2003 : Generation of reactive oxygen species in biological systems. Comments on Toxicology, 9, 5-21.

Baser K.H.C. et Buchbauer G., 2010 : Handbook of essential oils: science, technology, and applications, Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America, p. 994

Baudoux D., 2000 : L’aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles. *Ed Atlantica*.

Bekhechi .C., Atik-Bekkara .F., ABDELOUAHID .D.E., 2008 : Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d’*Origanum glandulosum* d’Algérie. *Phytothérapie*, 6, 153-159.

Belaiche P., 1979 :L’aromatogramme. Traité de phytothérapie et d’aromathérapie. M.S.A.Editeur, Paris.Tome 1, p :204

Belyagoubi .L., 2006 : Effet de quelque essence végétale sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Thèse de magister. Inédite. Univ. Tlemcen. **183**:191-195.

- Benzie I. F., Strain J., 1996:** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Benzie I.F.F., Strain J.J., 1996):** the ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239: 70–76.
- Bergogne-Berezin .E., Dellamonica .P., 1995** Antibiothérapie en pratique clinique. *Ed Masson*, Paris, 486 p.
- Bernard.T. et col.,** « Extraction des huiles essentielles :chimie et technologie» , *Information chimie* N°298,1988.
- BESOHBS .C., 2008 :** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrotmécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de Doctorat de l'Université de la Rochelle, France
- Besombes .C., 2008 :** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse Doctorat. Univ. De la Rochelle, p. 41-45.
- Besombes C., 2008.** Contribution a l'etude des phenomenes d'extraction
- Billings. J., Sherman. P. W. , 1998 :** Antimicrobial function of spices. *Q Rev Biol.* 73: 3-49.
- BOUCHONNET .S. et LIBONG. D., 2002 :** Le couplage Chromatographique en phase gazeuse Spectrométrie de masse. Département de Chimie, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels. Ecole Polytechnique, PLAISEAU Cedex.
- Bouhdid .S., Idaomar .M., Zhiri .A., Baudoux. D, Skali .N.S., Abrini .J., 2006:** Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities- Congrès International de Biochimie. Agadir; Vol; 09; pp12.
- Bouzouita. N., kachouri.f ., hamdi. m., chaabouni.m-m ., 2008 :** composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de juniperus phoenicea : *journal de la société chimique de tunisie*, 10, 119-125
- Boz .I., Burzo .I., Zamfirache. M.M., Toma .C., Padurariu .C., 2009 :** Glandular trichomes and essential oil composition of *Thymus pannonicus* All. (Lamiaceae). *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, pp.36-39.
- Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier, 2^{ème} édition, Paris. 915p.

Bruneton. J., 1999 - Pharmacognosie- photochimie, plantes médicinales, 2em édition. Ed. Tec et Doc Lavoisier. Paris.

Burt .S.A., 2004 : Essential oils: their antibacterial properties and potential application in Food. *International Journal of Food Microbiology*, **94(3)**,22-25.

C

Cavalli .J.F., 2002 : Caractérisation CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse.

Chambers .H. F., 1997: Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10** : 781-791. Chicoutimi, Québec.

Choudhury .S., Ahmed R., Kanjilal P. B. et Lecercq P. A., 1998 : Composition of the seed oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Northeast India. *J. of Essential Oil Research*, **10** : 588- 590.

Chun .S. S., Vatter D.A., Lin Y.T., Shetty. K., 2005: Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process. Biochem.* **40**: 809-816. d'utilisation centre de formation en aromathérapie.

Clement.J.M., 1981 : «Larousse agricole», éd. Larousse , hydrothermomecaniqued'herbes aromatiques. Applications generalisees. These Doctorat.

D

Dapkevicius .A., Venskutonis. R., Van Beek .T.A., LinsseJ.P.H., 1998 :Antioxidantactivity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbsgrown in Lithuania. *Journal of Science Food and Agriculture*,p: 140-146.

Dob .T., Dahmane .D., Chelghoum .C., (2006).Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus algeriensis*Boiss et Reuter- The *International Journal of Aromatherapy*; Vol. 16; pp 95-100.

Dorman. H. J. D. ET Deans .S. G., 2000, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, p: 308-316.

E

Englebin. M., 2011 : Essences et huile essentielle : précaution d'emplois et conseils

Ettayebi .K., El Yamani. J., Rossi-Hassani. B. D., 2000 : Synergistic effects of nisin and thymol on Extraction et analyse des huiles essentielles Oximation des aldéhydes naturels, Mémoire de magister. Université Montpellier II, p. 342.

Fluck.H ., 1977 : «Herbes médicinales » petit guide panoramique, éd. Delachaux et Nestlé SA,Paris .

Friedman. M., Henika. P. R., Mandrell .R. E., 2002: Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* **65** : 1545-1560.

G

Garnero .J., 1991 : Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. technique- Encyclopédie de médecines naturelles, paris, p. 2-20.

Gherman .G .,Culea. M., Cozar .O., 2000 : Comparative analysis of some active principales of herbs plants bu GC/MS. Vol. 53 ; pp 253-262, Group, LLC. United States of America, p. 994.

Guignard. J.L., 1995: Abrégé de botanique .éd. Masson, 285p

Gulfraz. M., Mehmood. S., Minhas .N., Jabeen. N., Kausar .R., Jabeen. K., Arshad G., 2008: Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*, *AfricanJournal of Biotechnology* Vol. 7 (24), p.4364-4368.

H

Haddaf .y., Kaloustian. J., Giordan .R., Regli. P., Chefrou .A., Abou.L., Mikail. C., ;Portugal .H. ,2004 : Cmposition chimique et activité antifongique des huiles essetielles de *thymus vulgaris* L et de *thymus numidicus* poiret d'algerie. 6^esymposium internatinal d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales, Grasse, France.

hamrouni.L ., 2012 : valorisation des plantes aromatiques et medecinales « pam » en tunisie p.1.43

Hazzit. M., 2002 : Arômes alimentaires. Thèse magister, USTHB, Alger. 96p.

Hilan .C., feir .R., Jawish .D., Aitour. S., 2006 : huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae. *Lebanese Science Journal* ; vol 67 ; pp 43-51.,

Hili. P., Evans. C. S., Veness. R. G., 1997: Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulfoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett Appl Microbiol* 24 : 269-275.

Huang .H.S., Chang L.H., Jong T.T., Nien .Y.F., Chang .C.M.J., 1987 : Supercritical carbon dioxide extraction of turmatic oil from *Curcuma longa* Linn., and purification of turmerones. *Separation and Purification Technology*. 47, p : 119- 125.

J

jean-christophe tardivon et chadouli si-mohamed ., 2012 : les plantes aromatiques et médicinales un exemple de développement humain au maroc la coopérative féminine de ben karrich – tétouan p 5. 20

K

Kalemba. D ., Kunicka .A., 2003 : Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*,**10**, 813-829.

Kanoun .K., 2011 : Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis*L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine), Mémoire de Magister, université Abou Bekr Belkaïd –Tlemcen-.

Kaufmann S. H. E., 1997: Host response to intracellular pathogens. *New York*. 345 p.

Kim .N.S. et Lee .D.S., 2002: Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography* . 98,p. 31-47. Labiateae family. Paper presented at VII international congress of essential oils (Cannes),p.118-123.

L

Lahlou .M., 2004 : Methods to study photochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18, p.p. 435-448.

Lahlou .M., 2004, Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytotherapy Research*, p. 435-448.

Lawrence. B.M., 1980 –:The existence of intraspecific differences in specific general in the

Lee S.J.; Umamo K., Shibamoto T.; Lee K.J.(2005).Identification of volatile component in basil (*Ocimum basilium L.*) and thymus leaves (*thymus vulgaris L.*) and thier antioxidant properties . Food Chemistry; vol91; pp 131-137,.

Legrand .G., 1993 : Manuel de préparateur en Pharmacie, Masson, Paris.

Legrand. G., 1978 : Manuel préparatoire en pharmacie, 8ème Edition, Ed. Masson, Paris.

Lucchesi .M.E., 2005 : Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.

M

Maffei et Sacco, 1987 :Perfumer and flavorist. Flavour and Fragrance Journal. 13 : p : 61.

Maihebiau. P., 1994 : La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. P : 635.

Malgalhae .L.M., Segundo .M.A., Reis. S., Lima .J., 2008: Methodological aspects about vitro evaluation of antioxidant properties, Analytica. Chemical. Acta, (613): 1-19.

Marc. F., Davin. A., Deglene-Benbrahim. L., Ferrand. C., Baccaunaud .M., Fritsch. P ., 2004 : Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. Med Sci (Paris), 20(4):458-463.

Medjouja .O., Benlifa .A., 2014 : Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales, Mémoire de licence, université Kasdi Merbah, Ouargla.

Medjouja .O., Benlifa. A., 2014 : Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales, Mémoire de licence, université Kasdi Merbah, Ouargla.

Miller. R.E. , Conville .Mc., Woodrow.M.J., Cyanogenic. I .E ., 2006: glycosides from the rare Australian endemic rianforest tree Clerodendrumgrayi (Lamiaceae) . phytochemistry ; vol67, pp43-51.

Mohammedi .Z., 2006 : Etude du pouvoir antimicroblen et antioxydant des huiles essentielles et flavonoides de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de magister, Département de Biologie, Faculté des sciences. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

Molyneux .P., 2004 : the use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity, Song Klama Karin J.Sci, Technol, 26 (2): 211-219.

Molyneux .P., 2004: the use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity, Song Klama Karin J.Sci, Technol, 26 (2): 211-219.

Morales .R., 2002: The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*.

N

Naghibi .F., Mosaddegh .M., Mohammadi .M.S. et Ghorbani . A., 2005 : Labiatae Family in folk Medicine in Iran :from Ethnobotany to Pharmacology-Iranian Journal of Pharmaceutical Research ;Vol.2 ;pp63-79.

Napoli . E. M., Curcuruto .G. et Ruberto .G., 2010 : Screening of the essential oil composition of wild Sicilian thyme. Biochem. Syst. Ecol. 38; 816–822.

Nataro .J. P., Kaper .J. B., 1998 : Diarrheagenic *E. coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11 : 142-201.

Ntezurubanza. L., 2000 : Les huiles essentielles du Rwanda. LASEVEUQAC,

O

Othmer.k. , «Encyclopaedia of chemical technology »,Volume 16,éd. M .G.Hill,1983.

Ouamba .J.M., 1991 : Valorisation chimique des plantes aromatiques du Congo,

P

Padrini .F. et Lucheroni. M.T., 1997 : La nature des huiles essentielles, Ed. Dexecchi.

Paolini .J., 2005 : Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM. (IE et IC et RMN du carbone-13 et de *Cistus albidus* et deux *Asteraceae* Endémique de Corse:*Eupatorium cannabinum subsp corsicum* et *Doronicum corsicum*. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse. France.

Parejo.I., Viladomat.T.F., Bastida.J., Rosas-Romero.A., Flerlage.N., Burillo.J., Codina. C., 2002 : Comparison between the radical scavenging activity and antioxydant activity of six distilled and non-distilled Mediterranean herbs and aromatic plants, J Agric. Food .Chem, (5): 6882-6884.

Pellegrini. N., Serafini .M., Colombi. B., 2003: Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays, J Nutr, 133(9): 2812-2819.

Pellegrini. N., Serafini. M., Colombi. B., 2003 : Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays, J Nutr, 133(9): 2812-2819.

Perfumer et Flavorist, 2009 : A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries, Vol. 34,

Perrin. A. et Colsan. M., 1985 : L'appareil secteur chez les menthes modalités de stockage des essences dans les grandes à tête pluricellulaires. Actes colloque : les menthes en France, aspect scientifique, économique et industrielle. Université CLAUDE BERNARD, Lyon I.

Perroti. C., Carfa. N., Sali, 1999 : se soigner par les plantes, ED, © berti édition, pp : VII-21,

Phipps .S., Sharaf .M., Butterweck. V., 2007: Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements, Pharmacopeial Forum, 33: 810-814.

Pibiri. M.C., 2006 : Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p : 177.

Ponce .A.G., Fritz .R .R., Del Valle C.E., Roura S.L., (2003). Antimicrobial activity of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft und- Technology, 36, 679-684.

Poole. K., 2001: Multidrugresistance in Gram negative bacteria. Current Opinion in Microbiology, 4, 500-508

Prior .R. L., Wu., X., Schaich K., 2005 : Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (10): 4290–4302.

Q

Quezel. p., M.s., 1962-1963 : nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques. CNRS, Paris.

R

Re .R., Pellegrini .N., Proteggente. A., Pannala. A., Yang. M., Rice- Evans .C., 1999 :
Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.
Free Radical Biology and Medicine, 26, 1231-1237.

Ricardo da Silva J.M., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S. (1991) .Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 549-1552

Rice-Evans .C.A., Miller. N.J., Bolwell. P.G., Bramley. P.M., Pridham. J.B., 1995) :The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radical Research, 22, 375-383.

S

Saidj F., 2006 : Extraction de l'huile essentielle de thym: *Thymus numidicus* kabylica- Thèse de magistère en Technologie des hydrocarbures, Département génie des procédés chimiques et pharmaceutiques; université M'Hamed Bougara – Boumerdes.

Salle .J.L. et Pelletier. J., 1991 : Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, pp.19-45.

Sánchez-Moreno C., 2002 : Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, Food Sci. Technol. Int, 8(3): 121-137.

Schauenberg .P. et Paris. F., 2010 : Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes, Ed. Delachaux et Niestlé, p.396.

Scimeca. D. et Tétou .M., 2005 : Votre santé par les huiles essentielles, Guide pratique pour prévenir et guérir tout les maux quotidiens, Ed. Alpen, p. 12,13.

Sharma Om .P., Bhat .T.K., 2009 : DPPH antioxidant assay revisited. Food chemistry, 113 (4), 1202.

Souza .E.L., Guerr. N.B., Stamford. T.L.M., Lima .E.O., 2006 : Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. Rev. Bras. Farm., p. 22-25.

Stahl Biskup. E., Saez . F., (Eds.), Thyme: The Genus *Thymus*. Taylor & Francis, London, pp. 1-43.

Stahl-Biskup. E., et Saez .F., 2002. :Thyme, The genus *Thymus*. Taylor and Francis. (331 pp).

T

Tepe .B., Sokmen .M., Akpulat .H.A., Sokmen .A., 2006: Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey, *Food Chem*, (95): 200-204.

Tepe. B., Sokmen M., Akpulat .H.A., S okmen. A., 2006: Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey, *Food Chem*, (95): 200-204.

U

Ultee .A., Slump. R. A., Steging. G., Smid .E. J., 2000 Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J. of Food Protection*. 620-624.

V

Valnet .J., 1984 : Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris p 544.

Annexes

Matériels non biologiques

Verrerie et autre

Bécher

Boîtes de pétri

Disques stériles

Ecouvillons

Eppendrofs

Eprouvette gradués

Flacons

Micropipettes (100, 1000 μ l)

Pied à coulisse

Pince

Pipettes pasteur

Spatule

Tube à essai

Tube sec

Appareillage

Agitateur à tube

Autoclave

Bain marie

Balance analytique de précision

Bec benzen

Centrifugeuse

Compteur de colonie

Etuve 37°C

Hydrodistilateur

Plaque chauffante avec agitation

Réfrigérateur

Pycnomètre

réfractomètre

Réactifs et additifs et autre

Eau distille

Ethanol

d'hydroxyde de potassium (KOH)

Hcl

phénolphtaléine

Composition des principaux milieux de culture utilisés

Eau peptonné (EP)

Composition en g/l :

Protéose peptone.....10g.

Peptone.....10g.

Chlorure de sodium.....5g.

Stérilisation à 121°C/15mn.

tryptone-soy-de-browth (TSB)

Composition en g/l :

Tryptone.....17g.

Peptone de soja.....3g.

Glucose.....2,5g.

Nacl.....5g.

Phosphate dipotassique.....2,5g.

Extré de levure.....0,6%.

Stérilisation à 121°C/15mn.



Montage d'un hydrodistillateur
Clevenger



balance analytique De type
de précision



Etuve



Autoclave



Bain marie



Centrifugeuse



Réfrigérateur



Compteur de colonie



Plaque chauffante avec agitation



Agitateur à tube