

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الجيلاي بونعامة خميس مليانة
Université Djilali BOUNAAMA de Khemis Miliana



Faculté des Sciences et de la Technologie
Département de Technologie.

Mémoire du Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention de diplôme
Master
En
Génie des Procédés
Spécialité : Génie Pharmaceutique

Thème

**Caractérisation et étude de l'extraction de
l'huile essentielle du plante médicinale : le
Thymus algeriensis .**

Présenté par :

M^{elle} Meziane ben tahar meziane Khawla

M^{elle} Dilmi Loubna

Devant le Jury :

Mr. Hachama Kamel

Président

Mme . HADJ KHELIFA LILA

Examinatrice

Mme. HAMAD.T

Promotrice

Année universitaire : 2022/2023

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier **ALLAH** Le Tout Puissant et Miséricordieux, qui nous a donné la santé, la force, la patience et la volonté afin d'accomplir ce modeste travail.

Nous exprimons notre reconnaissance et profonde gratitude à notre promotrice madame **HAMAD TAOUS**, pour son encadrement des plus enrichissants et pour nous avoir guidé et orienté tout au long de la réalisation de ce travail pour toujours viser la perfection et se surpasser pour donner le meilleur de soi-même.

Nous remercions vivement, les membres du jury , **Mme . HADJ KHELIFA LILA** d'avoir accepté de présider le jury de la soutenance de ce mémoire. A **Mr. HACHAMA KAMEL** pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger ce travail.

Nous désirons encore remercier les enseignants de **l'université de Khemis Miliana**, qui ont fourni tous les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour,

Le respect, la reconnaissance...

Je dédie ce modeste travail à :

La lumière de ma vie, ma mère pour leur encouragement et sacrifices que « Dieu » me la garde et la protège.

Mon père que « Dieu » l'accueille en son vaste paradis In chaallah

A mon fiancé Amine qui n'a pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de ce travail

Je dédie aussi cette réalisation à : Mon très cher frère Mohamed et mes très chères sœurs.

Aussi à toute la famille Meziane ben Tahar Meziane et la famille Aouameur

A Ma cher binôme : Loubna

A mes très chères amies ; Aicha , , Yasmina, Fatima Z, Rahma

A tous mes camarades de la promotion 2022/2023 et à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail

KHawla

Dédicace

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de mes efforts à ceux que j'aime le plus au monde mes très chers parents pour leurs sacrifices et leurs encouragements toute ma vie, je ne saurais jamais comment les exprimer mes sentiments pour avoir veillé sur mon éducation, jamais je ne peux les remercier assez de m'avoir donné le meilleur.

À mon fiancé Hamza qui n'a pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de ce travail

À ma chère sœur Ines

À mes chers frères : Djaafer, Rafik et Ibrahim

À tous mes amis Aicha, Ilham, Dounia, Khawla et Hala

À mon binôme Khawla avec qui j'ai partagé les bons et les durs moments.

À toute ma famille et à tout ce qui me connaissent je vous aime.

À tous mes oncles, mes tantes, mes cousins et à tous les étudiants de la promotion 2022/2023

Loubna.....

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations et symboles

Résumé

Introduction Générale 1

Chapitre I. Synthèse bibliographique

I.2. Le genre Thymus 3

 I.1.1. Historique 3

 I.1.2. Répartition géographique du Thym 4

 I.1.2.1 Dans le monde 4

 I.1.2.2. En Algérie..... 4

 I-2.3. Classification 5

 I.1.4 Culture..... 6

 I.1.5 Description morphologique du Thym 7

 I.1.6 Principes actifs du Thym 8

 I.1.7 Domaine d’usage du Thym 9

 I.1.8 Propriétés biologiques des huiles essentielles du thym et de ses composés 10

 I.1.8.1.Propriétés anti-inflammatoires : 11

 I.1.8.2.Propriétés antibacteriennes 11

 I.1.8.3.Propriétés antioxydantes..... 11

 I.1.9 Composition chimique de l’HE du thym 12

 I.1.10 Toxicité et précautions d’emploi 14

I.2. Les huiles essentielles 14

 I.2.1. Histoire et origine 14

 I.2.2. Définition des huiles essentielles..... 15

 I.2.3. Localisation de l’huile essentielle dans la plante..... 15

 I.2.4. Propriétés physico-chimiques 17

 I.2.4.1. Propriétés physico-chimiques..... 18

 I.2.4.2. Analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles 19

I.2.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	22
I.2.5.1. Distillation	22
I.2.5.2. Entrainement à la vapeur d'eau	24
I.2.5.3. Extraction par le CO ₂ à l'état supercritique.....	25
I.2.5.4 Hydrodiffusion	26
I.2.5.5 Extraction par micro-ondes	27
I.2.5.6 Expression à froid.....	28
I.2.5.7 L'extraction par solvants volatils	29
I.2.5.8 Autres méthodes d'obtention de l'huile essentielle.....	30
I.2.6. Composition chimique des huiles essentielles.....	31
I.2.6.1. Terpènes et terpénoïdes	31
I.2.6.2. Les composés aromatiques	32
I.2.6.3. Composés d'origine diverses	33
I.2.7. Les activités biologiques des huiles essentielles	33
I.2.7.1. Activités antibactériennes.....	33
I.2.7.2. Activités antioxydants	34
I.2.7.3. Activités inflammatoires.....	35
I.2.8. Conservation et étiquetage des huiles essentielles.....	35
I.2.8.1. Conservation.....	35
I.2.8.2. étiquetage	35
I.2.9. Application médicale des HEs.....	35
I.2.9.1 En pharmacie.	35
I.2.9.2. En parfumerie et cosmétologie	36
I.2.9.3. Dans les industries agro-alimentaires	37
I.2.9.4. Aromathérapie	37
I.2.9.5. En dentisterie	37
I.2.9.6. Diverses industries.....	38
I.2.10 Toxicité des huiles essentielles	39

Chapitre II. Matériels et méthode

II.1. Introduction.....	40
II.2. Matériels et méthode.....	42
II.2.1. Matériel utilisé.....	42
II.2.1.1. Appareillage utilisé	42

II.2.1.2. Matériel végétal.....	42
II.2.1.3 Séchage de la plante	43
II.2.2. Méthodes	43
II.2.2.1. Extraction par l'hydrodistillation	43
II.2.2.1.1. Montage de l'hydrodistillation	43
II.2.2.1.2. Protocole d'extraction.....	44
II.2.2.1.3. Conservation de l'huile essentielle	44
II.2.2.2 Détermination du Rendement d'extraction.....	45
II.2.2.3 Détermination du Taux d'humidité.....	46
II.2.2.4 Etude de la cinétique d'extraction.....	47
II.3. Caractérisation de l'huile essentielle de Thym.....	47
II.3.1. Analyse physique	47
II.3.1.1. Caractéristiques organoleptiques	47
II.3.1.2. Détermination des propriétés physico-chimiques.	47
II.3.1.2.1. La densité relative	48
II.3.1.2.2. L'indice de réfraction	48
II.3.1.2.3. Potentiel d'hydrogène (PH)	49
II.3.1.2.4. La masse volumique	49
II.3.2. Analyses chimiques.....	50
II.3.2.1. Indice d'acide	50
II.3.2.2. Indice de saponification.....	51
II.3.2.3. Indice d'ester	52
II.3.3. Analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS).....	53
II.3.4 Activité anti-reflux	56
II.3.5 Activité antiacide	57
II.4. Activités biologiques.....	58
II.4.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE	58
II.4.2. Activité antioxydante	63
II.4.3 Activité anti inflammatoire	67

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Détermination du Taux d'humidité	69
III.2. Cinétique et rendement d'extraction de l'huile essentielle.....	70
III.2.1. Etude cinétique de l'extraction de l'HE de Thym à partir de feuilles sèches	70
III.2.2 Etude cinétique de l'extraction de l'HE de Thym fraîche.	71
III.2.3. Rendement en huile essentielle	72
III.3. Analyse physique.....	72
III.3.1. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Thym	72
III.3.2. Les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de Thym	73
III.4. Analyse chimique	73
III.4.1. Analyse de la Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CPG/SM)	77
III.4.2. Activité antiacide	80
III.4.3. Activité anti reflux	81
III.5. Analyses biologiques	81
III.5.1. Etude de l'activité anti-oxydant.....	81
III.5.1.1. Détermination d'IC50.....	82
III.5.2. Etude de l'activité antimicrobienne de Thym.....	83
III.5.3. Activité anti-inflammatoire.....	86
Conclusion Générale	90

Référence bibliographique

Liste des figures

Figure I. 1 :Distribution géographique de thym dans le monde.....	4
Figure I. 2 :Différents espèces du Thymus	7
Figure I. 3 : Feuilles de différentes espèces du Thym:	8
Figure I. 4 : Fleurs de différentes espèces du Thym.	8
Figure I. 5 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles. (A): poil sécréteur de Mentha pulegium), (B): trichome glandulaire de Mentha pulegium, (C): trichome glandulaire de Lippia scaberrima et (D): structure de trichome glandulaire de Thymus.....	17
Figure I. 6 : Appareillage pour une CPG	17
Figure I.7 : Schéma de couplage CPG/SM	21
Figure I. 8 : Modes d'extraction des huiles essentielles.....	22
Figure I. 9 : Montage d'extraction par la technique d'hydrodistillation	23
Figure I. 10 : Principe schématisé de l'extraction par entrainement à la vapeur (EVE)	24
Figure I. 11 : Schéma simplifié d'une opération d'extraction au CO2 avec séparation par détente	26
Figure I. 12 : Hydrodiffusion	27
Figure I. 13 : Dispositif d'extraction assistée par micro-ondes	27
Figure I. 14 : L'extraction par solvants volatils	30
Figure I. 15 :Expression mécanique à froid	31
Figure I. 16 : Exemples de Structure chimique de terpènes.....	32
Figure I. 17 : Des médicaments à base d'HE	36
Figure I. 18 : Utilisation d'HE dans la cosmétique	37
Figure II. 1 : Diagramme général de la procédure expérimentale	41
Figure II. 2 : Montage d'hydrodistillation.....	44
Figure II. 3 : Réfractomètre d'Abbe	49
Figure II. 4 . Photo représentant la détermination de l'indice d'acide	51
Figure II. 5 . Photo représentant la détermination de l'indice de saponification.....	52
Figure II. 6 : Photo représentant le montage CPG/SM utilis	54
Figure .II. 7 : Photos de l'activité anti-reflux.....	57
Figure .II. 8 : Photos de l'activité antiacide.	58
Figure II. 9 : Principe de la diffusion sur disque.....	58
Figure II. 10 : Préparation des différentes dilutions	60
Figure II.11 . Photo représentant les préparations des suspensions microbiennes	61

Figure II.12. Photo représentant L'étape de l'ensemencement sur la surface gélose d'une boîte	62
Figure II. 13 : Le dépôt des disques sur une surface gélosée.....	62
Figure II. 14 : Photo représentant l'incubation des boites	63
Figure II. 15. Préparation d'une solution éthanolique de DPPH	64
Figure II. 16. Essais de DPPH avec les différents volumes de solution mère	65
Figure III. 1 : Teneur en humidité de thym	69
Figure III. 2 : Evolution du rendement d'extraction de l'HE de Thym sec en fonction du temps	70
Figure III. 3 : Evolution du rendement d'extraction de l'HE de Thym frais en fonction de temps	71
Figure III. 4 : Photo représentant la lecture du résultat au réfractomètre	74
Figure III. 5 : Photo représentant le pH de l'HE de Thym	75
Figure III. 6 : neutralisation	76
Figure.III. 7 : chromatographie en phase gazeuse couplée avec spectromètre.....	79
Figure III. 8 : Evolution du PH en fonction du temps	80
Figure III. 9: Pourcentage d'inhibition de l'HE et acide ascorbique de Thym par la méthode du DPPH.....	81
Figure .III. 10 : Représentation schématique de l'IC50 de l'HE et la vitamine C.....	82
Figure III. 11 : Diagramme de diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'activité antibactérienne de l'H.E de Thym en fonction de se concentrations	84
Figure. III. 12 : pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique par l'HE de Thym	87
Figure. III. 13 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique par l'HE de Thym	88

Liste des tableaux

Tableau I. 1 : Localisation de quelques espèces de genre Thymus en Algérie.....	5
Tableau I. 2 : Classification du thym	5
Tableau I. 3 : Composition chimique de quelques espèces de Thym.	12
Tableau I. 4 : Exemples de la diversité d'applications des huiles essentielles	38
Tableau II. 1 : Lieu et tâches effectuées	40
Tableau II. 2 : Liste d'appareillages, de verreries et de produits utilisés dans notre étude expérimentale.	42

Tableau II. 3 : Rendements de l'HE de Thym en Algérie et dans différentes régions du monde	45
Tableau II. 4 : Caractéristiques physicochimiques de l'HE de thym	47
Tableau II. 5 : Composition chimique de l'huile essentielle de Thym	55
Tableau II. 6 : Descriptions des différents microorganismes utilisés dans cette étude.	59
Tableau III. 1 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Thym.....	72
Tableau III. 2 : la densité de l'HE étudiée	73
Tableau III. 3 : Indice de réfraction de l'HE étudiée.....	74
Tableau III. 4 : Indice d'acide de l'huile essentielle.....	75
Tableau III. 5 : Indice de saponification de l'huile essentielle	76
Tableau III. 6 : Indice d'ester de l'huile essentielle.....	77
Tableau III. 7 : Composition chimique de l'huile essentielle de Thym	78
Tableau III. 8 : Estimation de l'activité antimicrobienne de notre HE pure sur les bactéries testées	84
Tableau III. 9 : Diamètres des zones d'inhibition à différentes concentrations de l'HE testée et sensibilité des souches	85
Tableau III. 10 : Pourcentage d'inhibition d'HE de Thym par le model d'Ovalbumine	86
Tableau III. 11 : Pourcentage d'inhibition d'HE de Thym par le model de BSA	88

Liste des abréviations et symboles

%	Pourcentage
Ab	Absorbance
AFNOR	Association Française de Normalisation
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament
Asp	Aspirine
ATCC	American type culture collection
BSA	Albumine de sérum bovin
C	Concentration
CCM	Chromatographie sur couche mince
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CO₂	Dioxyde de carbone
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse
Ct	Chimiotype

D	Densité
DI	Diamètre d'inhibition
Dic	Diclofénac de sodium
DMSO	Diméthyle Sulfoxyde
DPPH	1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl
E.coli	Escherichia coli
EVE	Entrainement à la vapeur d'eau
H %	Taux d'humidité exprimé en pourcentage
HA	Hydrolat aromatique
HE	Huile essentielle
I_A	L'indice d'acide
IC₅₀	Concentration équivalente requise pour réduire 50% des radicaux libres
I_E	L'indice d'ester
IPS	Initialement présents en solution
INSA	Institut de Normalisation Scientifique d'Aromatologie
Ir	Indices de rétention
Is	L'indice de saponification
KOH	Hydroxyde de potassium
M	Masse de l'huile
Mf	Matière végétale fraîche
MH	Milieu Mueller Hilton
Min	Minute
Ms	Matière végétale sèche
Mv	Matière végétale
P.aeruginosa	Pseudo monasaeruginosa
PA	Poids de la plante sèche en g
PAM	Plante aromatique et médicinale
PB	Poids de l'huile en g
pH	Potentiel d'hydrogène
PI	Pourcentage d'inhibition
R %	Rendement
RHE	Rendement de l'huile essentielle
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire

ROS	Reactive Oxygène Specis
S. aureus	Staphylococcus aureus
T	Température
TR	Temps de rétention
UV	Ultra-violet
V	Volume d'huile

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تحديد التركيب الكيميائي للزيت الأساسي لنبتة عطرية وطبية (الزعتر) يتم حصادها من منطقة عين الدفلى. وكذلك تحديد أنشطتها البيولوجية. تم استخلاص هذا الزيت باستخدام تقنية التقطير المائي قدر مردودها ب (3.34%). تم تحليل هذه الزيوت الأساسية بواسطة كروماتوغرافيا الغاز المقترن بقياس الطيف الكتلي. مكن الفحص الكيميائي النباتي من تحديد مونوثيغبان كأغلبية المكونات. وهكذا حددت CG/MS 23 مركبًا لزيت الزعتر مع فاعم ثيمول (68.67%)، ليناتول (2.88 %) قاما ثيغبان (9.22) و بانزان (7.71%) كمكونات ذات تمثيل اغلب .

تم قياس النشاط المضاد للميكروبات للزيت العطري بطريقة انتشار القرص. تم فحص الزيت العطري بحثًا عن نشاطه المحتمل كمضاد للبكتيريا في المختبر مقابل ثلاث سلالات من البكتيريا المسببة للأمراض , *pseudo aeruginosa* , *Esherichia coli*, *staphylococcus aureus*، وقد أظهرت النتائج ان هذا الزيت له فاعلية مهمة كمضاد للبكتيريا

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر من خلال طريقة DPPH بمقارنته مع حمض الأسكوربيك (فيتامين ج). تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن زيت الزعتر يمارس قوة اختزالية مهمة مع تركيز فعال $IC_{50} = 11.19$ ميكروغرام /مل

أخيرًا تم تقييم النشاط المضاد للالتهاب التي تحققت حسب طريقة التثبيت البروتينات و من النتائج المتحصل عليها تبين أن المستخلصين l'Ovalbumine و BSA يمكن أن نشاط مضاد للالتهاب .

الكلمات المفتاحية: الزعتر، زيت عطري ، التقطير المائي ، أنشطة بيولوجية

Résumé :

L'objectif de ce travail est la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle (HE) d'une plante aromatique et médicinale : Le *Thymus algériensis* récolté dans la région d'Ain defla. Ainsi que la détermination de ses activités biologiques. Nous avons récupéré une huile par la technique d'hydro-distillation dont le rendement a atteint 3.34%. Cette huile essentielle a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Le criblage phytochimique a permis d'identifier les monoterpènes comme constituants majoritaires. Ainsi, la CG/MS a recensé 23 composés pour l'HE *Thymus algériensis* du dont le Le thymol (68.67%), γ -Terpinen (9.22 %), benzene (7.71 %) et Linalool L (2.88 %).

L'activité antimicrobienne de l'HE est mesurée par la méthode de diffusion de disque. L'huile essentielle a été soumise à un criblage pour son activité antibactérienne et antifongique possible in vitro, contre trois souches de bactéries pathogènes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Esherichia coli*, *Staphylococcus aureus*). Les résultats montrent un pouvoir antibactérien.

L'activité anti-oxydante in vitro a été évaluée par la méthode de DPPH en comparant avec l'acide ascorbique (Vit C), Les résultats obtenus montrent que l'huile de laurier nobilis exerce un pouvoir réducteur important avec une $IC_{50} = 11.19 \mu\text{g/ml}$.

Finalement , consiste à étudier l'activité anti-inflammatoire selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines et d'après les résultats obtenus, L'extrait l'Ovalbumine et BSA sont dotés d'une forte activité anti-inflammatoire .

Mots clés : *Thymus algériensis*, huile essentielle, hydrodistillation, activité biologique.

Abstract

The objective of this work is to determine the chemical composition of the essential oil (HE) of an aromatic and medicinal plant :thym, harvested from the region of Ain defla. As well as the determination of its biological activities. We recovered these oils by the hydro-distillation technique whose yield 3.34%. These essential oil were analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Phytochemical screening identified monoterpenes as the majority constituents. Thus, the CG/MS identified 24 compounds for essential oil of *Thymus algériensis* with the phenol (68.67%), γ -Terpinen (9.22 %), benzene (7.71 %) and Linalool L (2.88 %).

The antimicrobial activity of HE is measured by the disk diffusion method. Essential oil was screened for antibacterial and antifungal activity possible in vitro against three strains of pathogenic bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) the results show an important antibacterial.

The in vitro antioxidant activity was evaluated by the DPPH method by comparing with ascorbic acid (Vit C).The results obtained show that *Thymus algériensis* oil exerts a significant reductive power with an $EC_{50} = 11.19 \mu\text{g/ml}$.

Finally ; consists in studying the anti-inflammatory activity according to the method of inhibition of the denaturation of the proteins and according to the results obtained, the extract l'Ovalbumine and BSA are endowed with a strong anti-inflammatory activity .

Key words: *Thymus algériensis* , essential oil, hydro-distillation, biological activities.



Introduction

Générale



Introduction Générale

Introduction Générale

Les plantes ont, toujours, fait partie de la vie quotidienne de l'homme, il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois dans ses rites religieux. Elles ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pendant plusieurs millénaires et à travers les siècles, la connaissance des plantes médicinales et des remèdes végétaux n'a pas cessé de s'enrichir [1].

Actuellement, cette médication, par les plantes, connaît un regain d'intérêt notable, et, c'est grâce aux études scientifiques basées sur les méthodes analytiques et les expérimentations nouvelles, que le monde médicale découvre de plus en plus, le bien fondé des prescriptions empiriques des plantes médicinales [2].

L'Algérie possède une position géographique particulière lui accordant une large bande de végétation très variée notamment les plantes aromatiques médicinales. La flore algérienne recèle un patrimoine végétal très riche, mais peu connu par manque d'études sur les vertus et les richesses qu'il peut probablement engendrer, celui-ci est malheureusement très peu exploité [3] L'une des valorisations possibles de cette richesse naturelle, que sont les plantes, est l'extraction de leurs huiles essentielles ; produits connus et utilisés par les égyptiens, les perses et les grecs, pour leurs propriétés aromatisants et médicinales [4].

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition que de leur rendement. Cette variabilité est fondamentale car les activités qui découlent des huiles essentielles peuvent être très différentes [5 _ 7].

A cet effet, dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne et à travers une étude bibliographique approfondie, on s'est intéressé à une espèce de la famille des lamiacées l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort Pouvoir antimicrobien et antioxydant [8].

La plante sur laquelle a porté notre choix est l'espèce *Thymus*, et plus précisément, le genre *Thymus algériensis*, ce choix est justifié par le fait que cette plante est riche en principes actifs (huiles essentielles) et possède des activités biologiques diverses et importantes [9 _12]

Introduction Générale

Le travail entrepris dans le cadre de ce mémoire se propose d'approfondir les connaissances sur la composition chimique et l'activité biologique de l'HE de Thym. Pour cela nous avons appliqué des méthodes d'extraction et d'analyse des composés bioactifs en utilisant comme matière végétal le *Thymus algeriensis* de la région d'Ain Defla.

Dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique sera présentée sur les huiles essentielles, les différentes techniques extractives et la description de la plante utilisée dans ce travail.

La deuxième partie du manuscrit présentera les matériels et les méthodes utilisés, notamment l'extraction de huiles essentielle et l'analyse de sa composition chimique, l'étude de son l'activité antimicrobienne, antioxydant et anti inflammatoire.

La troisième partie présentera une discussion des résultats qui sera finalisée par une conclusion et des perspectives..



Chapitre I
Synthèse
bibliographique



I.1 Le genre *Thymus* :

I.1.1 Historique :

Le thym est une des plantes aromatiques les plus employées en thérapeutique depuis les temps les plus anciens. Il a toujours accompagné la vie quotidienne des humains [13] et depuis la haute antiquité, les égyptiens l'utilisaient pour embaumer les corps. Théophraste, au 4^{ème} siècle avant J. C a cité les deux espèces sauvages serpolet et vulgaire, qu'il appelle les thymus blanc et noir. Aetius, général Romain à la fin du 4^{ème} siècle ; parle de poudre de thym pour les goutteux, les douleurs de reins et de la vessie et en 1887, Chamberland démontra l'action bactéricide de l'essence de thym (notamment vis - à- vis du bacille du charbon) [14].

Le nom "*Thymus*" provient du mot grec « thymon » qui signifie "parfum" à cause de l'odeur agréable que la plante dégage naturellement ou lorsqu'on la fait brûler [15]. L'espèce la plus connue parmi les Lamiacées est sans conteste ***Thymus***. Elle renferme des qualités aromatiques et de nombreuses propriétés médicinales. En français et en anglais par exemple, on emploie fréquemment le nom du genre ("thym" et "thyme" respectivement) pour désigner l'espèce *Thymus vulgaris*, et elle est connue en Algérie sous le nom de "zaatar" [16].

Le genre *Thymus* appartient à la famille des Lamiacées, anciennement appelée Labiées en raison de la corolle en deux lèvres de ses petites fleurs. C'est l'une des familles les plus larges dans le règne végétal. Elle comprend approximativement 240 genres et 7200 espèces [17]. Elle est une des principales familles productrices d'huiles essentielles et ce sont des plantes qui sont énormément utilisées et connues en tant que herbes aromatiques [18].

Au sein de la famille des lamiacées, le genre *Thymus* est l'un des huit genres les plus importants en ce qui concerne le nombre d'espèces incluses, bien que ce nombre varie selon le point de vue taxonomique [19].

Le genre *Thymus* regroupe environ 110 espèces différentes se concentrant dans le bassin méditerranéen [20] et selon [21], le genre de *Thymus* est un genre de détermination toujours délicate, en raison de l'extrême variabilité des espèces et des hybridations interspécifiques. Les espèces algériennes à feuilles linéaires constituent en particulier un complexe qu'il est souvent illusoire de chercher à déterminer d'une façon précise.

I.1.2 Répartition géographique du Thym :

➤ I.1.2.1 Dans le monde :

Le thym est distribué dans le nord-ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d’Ethiopie et la péninsule du Sinaï en Egypte. Passant par les régions arides de l’Asie occidentale jusqu’à Himalaya. Dans le nord il pousse en Sibérie et en Europe nordique [22] (**Figure I. 1**).

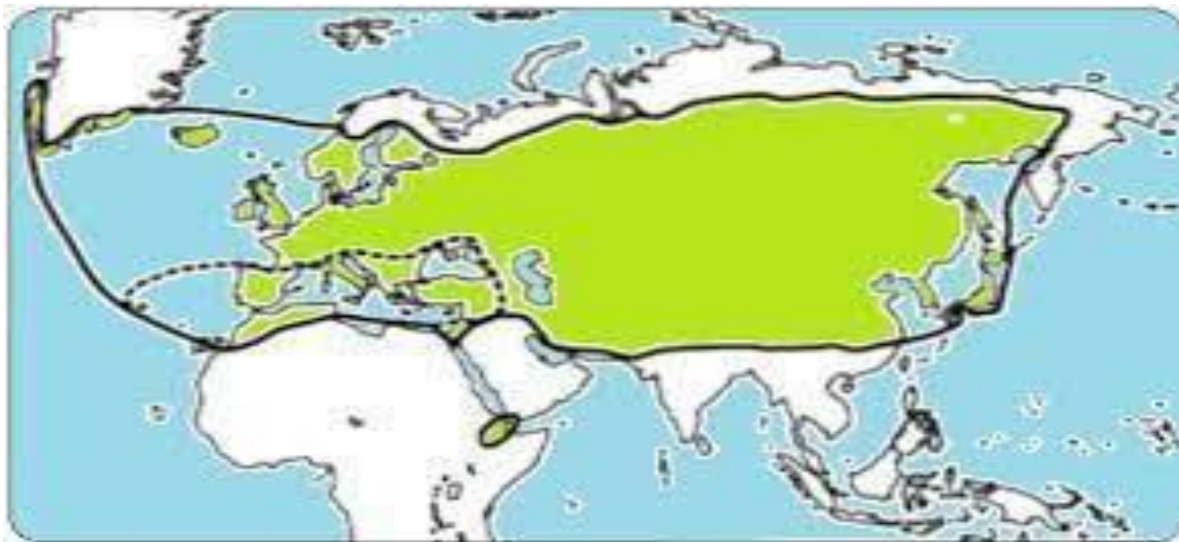


Figure I. 1 : Distribution géographique de thym dans le monde
(Le cercle noir représente la zone de distribution du genre *Thymus* dans le monde).[19]

➤ I.1.2.2 En Algérie :

Le *Thymus* comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu’au zones arides. Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces. Le tableau 1 montre la localisation des principales espèces de thym en Algérie [23] .

Tableau I. 1 : Localisation de quelques espèces de genre Thymus en Algérie

Espèces	Découverte par	Localisation
Thymus capitatus	Hoffman et Link Rare	Dans la région de Tlemcen
Thymus Fontanasi	Bois et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie-Tunisie.
Thymus commutatus	Battandier	Endémique Oran
Thymus numidicus	Poiret	Assez rare dans : La grande et la petite Kabylie
Thymus Algériensis	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord algérois

I-1.3 Classification : La classification de thym est présentée dans le **tableau I.2 [24]**.

Tableau I.2 : Classification du thym

Règne	Plantae (végétal)
Embranchement	Spermaphytes (phanérogames)
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Sous classe	Gamopétales (Astérisées)
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées

Genre	Thymus
-------	--------

I.1.4 Culture :

La culture des plantes du genre *Thymus* est considérée comme une possibilité intéressante pour fournir des revenus agricoles supplémentaires pour les agriculteurs, en raison de leur large utilisation dans les aliments, les industries cosmétiques et pharmaceutiques. Les plantes du genre *Thymus* sont des petites plantes vivaces aromatiques herbacées qui poussent dans un sol calcaire bien drainé et ont besoin de plein soleil pour développer leur plein potentiel. Graines, boutures, et la division des racines sont les méthodes les plus courantes pour leur propagation [25]. Les graines poussent dans les 1-2 semaines à 10-30 °C, la germination des graines est généralement accélérée par la lumière du soleil. Dans les climats tempérés ou chauds, le meilleur moment de propagation des graines de thym est le mois de Mars (à la fin de l'hiver). Le thym est également propagé à partir de boutures au printemps [26]. De plus, quand le thym commence à devenir ligneux et produit moins de feuilles, après trois ou quatre ans, la plante est séparée en utilisant la division des racines et replanté. Les rendements de thym pour la production d'herbes fraîches sont environ 5-6 t / ha, en fonction des conditions environnementales et fertilisation du sol.

Le thym ne devrait pas être fertilisé fortement, car les plantes sur-fertilisées tendent à montrer une croissance faible. Un engrais basal contenant de l'azote (qui est donnée après chaque récolte pour favoriser la croissance de nouvelles pousses pendant la saison de croissance), du phosphore, du potassium et du soufre devrait être appliqué annuellement pour influencer les concentrations finales des principaux composants et donc la qualité des huiles essentielles. Certaines études montrent qu'il existe une corrélation étroite entre l'augmentation de la production d'engrais et de thym [27]. Outre la fertilisation, d'autres facteurs agronomiques, tels que le type du sol, salinité, densité de plantation, période de récolte et irrigation ont un grand effet sur la production de phytomasse, et sur la qualité et la quantité d'huiles essentielles. La comparaison entre les compositions des huiles essentielles produites dans des conditions normales ou sous contrainte de sel, a montré que les compositions chimiques étaient similaires [28]. Sotomayor et al., (2004) [29] ont évalué l'influence de l'irrigation sur la production de

phytomasse et la composition d'huile essentielle de *Thymus zygis* subsp. *gracilis* (Boiss.). Ils ont testé trois différents niveaux d'arrosage correspondant à 63%, 44% et 30% de l'évapotranspiration potentielle. Ils ont trouvé que l'irrigation au niveau intermédiaire était optimale pour la production maximale de la matière végétale sèche et de rendement en huile essentielle. De plus, les huiles essentielles produites aux niveaux d'irrigation inférieurs et intermédiaires étaient plus riches en thymol. L'influence de l'espèce végétal et du moment de la récolte sur la croissance et la qualité de l'huile essentielle de *T. vulgaris* a été évaluée par Hassanali et al., (2004) [30].

I.1.5 Description morphologique du Thym :

Le thym est une plante basse sous-ligneuse, peut atteindre 40cm de hauteur, caractérisée par des feuilles verte foncé de 4–10 mm de long, et de forme elliptique à oblongue et à tige courte (**Figure .I.2**). Ces feuilles sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes), ces dernier contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de mono terpènes (**Figure .I.3**).

Les calices et les jeunes tiges sont aussi couverts de ces structures qui libèrent L'essence par simple contact, bien qu'en plus faible densité sur les tiges [31] Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose (Figure :4)[32] [12].

Le thym à une durée de vie allant de 4 à 7 ans [33]

La floraison a lieu de avril à septembre, Ses petites fleurs zygomorphes (**figure I.3**), sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par la rose, et sont très appréciées des abeilles [34].



Figure I. 2 : Différents espèces du Thymus



Figure I. 3 : Feuilles de différentes espèces du Thym



Figure I. 4 : Fleurs de différentes espèces du Thym.

I.1.6 Principes actifs du Thym :[35]

➤ Les acides phénoliques :

- Ils dérivent principalement de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique
- Les acides phénoliques comportent un radical COOH

- Ils se trouvent souvent sous la forme de glycosides ou d'esters.
- Les dérivés de l'acide benzoïque sont : l'acide hydroxybenzoïque, l'acide vanillique,
- l'acide syringique, l'acide dihydroxybenzoïque, l'acide gallique et l'acide ellagique obtenu par oxydation de l'acide gallique .
- Les dérivés de l'acide cinnamique sont : l'acide coumarique, l'acide férulique, l'acide sinapique et l'acide caféique .

➤ **Les flavonoïdes:**

- Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols
- Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phenyl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides .
- Les flavonoïdes ont un squelette de base commun constitué de 15 atomes de carbone assemblés en trois cycles nommés A, C et B .

Les tanins :

- sont des polyphénols.
- sont des composés phénoliques solubles dans l'eau et les solvants polaires.
- Ils présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines.
- On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure : les tanins hydrolysables et les tanins condensés .

I.1.7 Domaine d'usage du Thym :

a) **Usage traditionnel :**

Le thym est utilisé comme aromate en cuisine, c'est une plante condimentaire très appréciée en Algérie et dans différentes parties du monde pour aromatiser les plats, les fromages et les boissons alcoolisées. C'est une plante médicinale recommandée contre tous les types de

faiblesse, et indiquée pour les crampes d'estomac, les inflammations pulmonaires les palpitations, ainsi que les affections de la bouche .[36_ 38].

Il est considéré aussi comme l'un des remèdes populaires les plus utiles et efficaces, dans le traitement des affections respiratoires; rhume, grippe, et angine par trempage des feuilles sèches. Egalement Utilisé dans le nettoyage et la cicatrisation des plaies, l'expulsion des gaz intestinaux et contre la mauvaise digestion, grâce à ses propriétés stomachiques antiseptiques des voies respiratoires et pectorale[39,40].

b) Usage médicinal et pharmaceutique :

Les feuilles du thym sont riches en HES dont les propriétés sont mises en profit en phytothérapie et en médecine, comme produit vétérinaire (antiparasite, antispasmodique, antiseptique et digestif), en plus des études ont confirmé leur activités antiseptique et spasmolytique.

Le thym possède des vertus antiseptique utilisées pour soigner les infections pulmonaires, il calme les toux quinteuses, diminue les sécrétions nasales et soulage les problèmes intestinaux [41,42] Plus de 90 espèces de Lamiacée sont inscrites dans la pharmacopée parmi lesquelles le thym [43] .En pharmacie, le thymol et le carvacrol sont employés en collutoires, dans les dentifrices, les savons, les onguents, les lotions, les pastilles pour la gorge et les remèdes antigrippes.

Plusieurs études ont montré que le thymol possède de nombreuses activités biologiques telles que l'activité antispasmodique, antimicrobienne, fongicide, insecticide, antioxydante, anticancérigène et anti-inflammatoire [44]. Par ailleurs, les extraits de thym ont montré une large activité antibactérienne en inhibant la croissance des bactéries à Gram positif et Gram négatif [45]

c) Usage cosmétique :

Le thym herbe aromatique est connu pour son agréable odeur, il entre dans la composition de beaucoup de produits cosmétiques. L'huile essentielle du thym riche en thymol est utilisée pour la confection de savons, de produits de beauté, des parfums, des détergents,

d'articles de toilette, produits d'hygiène, et bien d'autres produits. Par ailleurs, il a été démontré que le thym est un bon remède contre la chute de cheveux[46] [42] [47] .

I.1.8 Propriétés biologiques des huiles essentielles du thym et de ses composés :

Le thym est incroyablement utilisé en cas des infections et des infections intestinales diverses, comme les ankylostomes, ascarides, bactéries à Gram positif et à Gram négatif, champignons et levures. Son principe actif, le thymol, est actif contre les entérobactéries et les bactéries cocci. Le thym peut aussi améliorer le fonctionnement du foie et agit comme un stimulant de l'appétit. Il sera utilisé dans le traitement des infections au niveau des tubes cartilagineux, bronchiques et urinaires. Il est utilisé comme gargarisme, et aussi dans le traitement de la laryngite et l'inflammation. Il est utilisé aussi pour les problèmes de peau comme les peaux grasses, sciatiques, acné, dermatite et des piqûres d'insectes. En aromathérapie, l'huile rouge et l'huile blanc du thym sont utilisées pour leurs actions douces sur la peau. Ainsi, l'huile du thym soulage les morsures, les piqûres et les douleurs nerveuses et rhumatismales.[48].

I.1.8.1.Propriétés anti-inflammatoires :

L'huile du thym est une combinaison de monoterpènes. La plupart des composés de cette huile sont le thymol qui est le terpénoïde naturel et le carvacrol qui est son composé chimique phénolique [49, 50]. Ils ont des effets antioxydants, antimicrobiens, antitussifs et antispasmodiques [51, 52].

I.1.8.2.Propriétés antibactériennes :

Les huiles essentielles obtenues à partir de *Thymus vulgaris* L. récoltées à 4 étapes de processus biologiques ont été évaluées pour leurs activités biologiques et sa composition chimique. Les huiles volatiles de thym ont été analysées pour leurs effets d'inhibition contre 9 souches de bactéries à Gram-négatif et 6 souches de bactéries à gram-positif. La méthodologie de la bioimpédance a été choisie pour évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle. La technique de comptage des plaques a été utilisée pour étudier l'effet inhibiteur par contact directe. Toutes les huiles essentielles de thym examinées avaient une activité bactériostatique contre les microorganismes testés. Cette activité était additionnelle marquée contre les bactéries Gram-

positifs. L'huile de thym entièrement fleuré était le premier efficace pour arrêter la croissance de l'espèce de microorganisme examinée. Les huiles testées ont montré une forte activité antibactérienne par contact direct : ils ont donné l'impression d'être actives contre les microorganismes de gram-négatifs. Certains nombres de ces espèces étaient capables de récupérer un minimum de 50% de leur fonction métabolique une fois en contact avec l'inhibiteur, alors que la plupart des souches se sont révélées avoir été inactives presque complètement [53].

I.1.8.3. Propriétés antioxydantes :

Un antioxydant est une molécule qui inhibe l'oxydation de différentes molécules.

L'oxydation est un processus chimique qui transfère des électrons ou des hydrogènes d'une substance à un agent oxydant. La réaction d'oxydation produira des radicaux libres. À leur tour, ces radicaux commenceront les réactions en chaîne. Une fois que la réaction en chaîne se produit dans une cellule, cela provoquera un dommage ou une mort de la cellule. Les antioxydants stoppent ces réactions en éliminant les intermédiaires de radicaux libres et en inhibant les différentes réactions d'oxydations.

Les feuilles du thym et de son huile sont utilisées dans les aliments pour la saveur, arôme et préservation et en outre dans les médicaments traditionnels. El-Nekeety et al. (2011) ont mené une expérience pour élaborer les éléments de l'huile de *Thymus vulgaris* L. et d'évaluer les effets protecteurs de cette huile contre l'aflatoxine qui provoque le stress oxydatif chez les rats. Les résultats ont indiqué que l'huile contient le carvacrol (45 mg / g), thymol (24.7 mg/g), β -phellandrene (9.7 mg/g), humuline (3.1 mg/g), α phellandrene (2.3 mg/g) et myrcene (2.1 mg/g). Cependant, α et β -pinène, α -thujone, tricyclène, 1, 8-cinéole et β -sabinène ont été trouvés avec des concentrations très faibles. Le traitement aux aflatoxines perturbe le profil lipidique dans le sérum sanguin, diminue la capacité antioxydante totale, augmenter la créatinine, l'acide urique et l'oxyde nitrique dans le sérum sanguin et la peroxydation lipidique dans le foie et les organes excréteurs avec des changements histologiques dans les tissus de foie [54].

I.1.9 Composition chimique de l'HE du thym :

L'essence du thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives [23]. Leur composition renferme des alcools, des phénols des aldéhydes, des cétones, des esters et quelques dérivés du phényle propane.

Le thymol et le carvacrol sont les plus importants constituants du genre *Thymus* (tableau I.3) sauf pour le *thymus serpyllum* qui est caractérisé par l'absence de ces composés [55]

Le tableau I.3 représente les différents composants majoritaires de l'huile essentielle de quelques espèces du thym :

Tableau I.3 : Composition chimique de quelques espèces de Thym.

Espece	Pays	Composition	Référence
T. vulgaris	Turquie	P-cymène 9.9%, Thymol 46.2%, Linalool 4%, γ -Terpinène 14.1%	[56]
T. vulgaris	Espagne	p-cymène 18.7% , Thymol 57.7%, Carvacrol 2.8%, Linalool 2.1%	[57]
T. rosulans	Turquie	Carvacrol 58.1%, p-cymène 4.1%, Thymol 20.5%, γ -terpinène	[58]
T. sipyleus	Turquie	Broneol 11.2%, Muurolo 9.2% β -caryophyllen 7.6%, Geranial 7.3%	[58]
T. zygis	Espagne	Linalool 82.3%, p-cymène 0.5% Thymol 2.1%, Carvacrol 0.1%	[57]
T. hyemalis	Espagne	p-cymène 16.0%, Thymol 43.0%, Carvacrol 2.4%, γ -terpinène 8.4%	[57]
T. capitatus	Sardinia (Italy)	p-cymène 26.4%, Thymol 29.3%, Carvacrol 10.8%, γ -terpinène 8.4%	[59]

T. vulgaris	Algérie	Thymol 4.92%, p-cymène 2.08%, γ -Terpinène 0.92%, Linalool 82.88%	[60]
T. herbabrone	Sardinia (Nord de Italy)	p-cymène 27.6%, Thymol 50.3%, Carvacrol 2.9%, γ -terpinène 6.1%, Linalool 5.8%	[59]
T. herbabrone	Sardinia (centre Italy)	p-cymène 5.2%, Thymol 46.9%, Carvacrol 20.6%, γ -terpinène 4.6%, Linalool 3.3%	[59]
T. serpyllum	Iran	p-cymène 21.12%, Thymol 18.73%, Carvacrol 1.34%, γ -terpinène 21.9%, Linalool 1.08%	[61]
T. pubescens	Iran	p-cymène 2.85%, thymol 11.94%, carvacrol 64.79%, γ -terpinène 6.12%	[61]

I.1.10 Toxicité et précautions d'emploi :

✚ L'usage en qualité d'épice du thym et de son huile essentielle, à des doses usuelles (jusqu'à 20 gouttes d'HE/jour) ne présente aucun risque de toxicité ni aiguë, ni chronique.

✚ Le potentiel de sensibilisation du thym est faible. Quelques réactions allergiques ont été observées ponctuellement, mais il existe des réactions croisées avec d'autres plantes de la famille des Lamiaceae. L'huile essentielle de thym ne provoque par contre aucune sensibilisation [66].

✚ L'huile essentielle utilisée à l'état pur sur la peau peut provoquer une irritation cutanée (dermocaustique) [67].

✚ Demandez un avis médical avant d'employer les préparations à base de thym pendant la grossesse et l'allaitement car nous ne disposons pas de connaissances scientifiques suffisantes à ce sujet.

✚ Les bains de thym sont contre indiqués en cas de blessures cutanées, de dermatoses, de fièvre, d'insuffisance cardiaque [68].

✚ L'usage du thymol par voie interne est contre indiqué en cas d'entérocrites, d'insuffisance cardiaque et durant la grossesse [69].

I.2 Les huiles essentielles

I.2.1 Histoire et origine :

Reconnues pour leurs puissantes propriétés thérapeutiques et utilisées depuis des millénaires en Chine (cannelle, anis, gingembre), en Inde, au Moyen Orient (khella, pin, fenouil...), en Egypte, en Grèce, en Amérique (Azèques, Mayas, Incas : bois de Hô, sassafras) et en Afrique (encens, myrrhe, ravensare), les huiles essentielles tombent dans l'oubli au Moyen Age.

A ce moment, l'Europe connaît un retour à la barbarie avec un déclin général du savoir. Il faudra attendre l'arrivée des Arabes pour assister à un nouvel essor de la médecine par les plantes qui retrouvent alors une place de choix dans l'arsenal thérapeutique de l'époque.

L'extraction des huiles essentielles par distillation à la vapeur d'eau naît à l'époque de la révolution industrielle et permet le développement de produits alimentaires et de parfums. Au début du XX^{ème} siècle, des chercheurs (Chamberland, Cadéac, Martindale) démontrent, par leurs expérimentations, le pouvoir antiseptique des huiles essentielles. Mais les véritables «pères» de l'aromathérapie sont Gattefossé puis Valnet et ses disciples. R.M. Gattefossé, pionnier de la parfumerie moderne se brûlant les mains lors d'une explosion dans son laboratoire, a le réflexe génial de plonger ses mains dans un récipient rempli d'huile essentielle de lavande. Soulagé instantanément, sa plaie se guérit avec une rapidité Déconcertante. Etonné par ce résultat, il décide d'étudier les huiles essentielles et leurs propriétés.

L'aromathérapie moderne était née. Toutefois, malgré son incontestable efficacité, l'aromathérapie ne reçoit pas des médecins, l'accueil qu'elle était en droit d'attendre. La concurrence des laboratoires de produits chimiques de synthèse, financièrement beaucoup plus

puissants, et une mauvaise utilisation des HEs. suite à une méconnaissance des différentes variétés pour une même espèce sont les raisons de l'absence d'utilisation de l'aromathérapie à cette époque.

aujourd'hui, des médecins (Valnet, Duraffourd, Lapraz, d'Hervincourt, Belaiche) et des chercheurs, des pharmaciens ont définitivement assis la réputation, l'efficacité et l'extraordinaire richesse des huiles essentielles.

I.2.2 Définition des huiles essentielles :

Plusieurs définitions disponibles d'une huile essentielle convergent sur le fait que les huiles essentielles, communément appelées " essences ", sont des produits de composition généralement assez complexe, renfermant les principes odorants volatils contenus dans les végétaux. Elles diffèrent des huiles fixes (huile d'olive,...) et des graisses végétales par leur caractère volatil ainsi que leur composition chimique.

L'AFNOR (Association française de la normalisation) définit l'huile essentielle comme « Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, Soit par entraînement à la vapeur d'eau soit par des procédés mécaniques, l'huile est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ». [70]

I.2.3 Localisation des huiles essentielles dans la plante :

Les huiles essentielles sont produites dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule. Elles sont alors stockées dans des cellules à huiles essentielles (Lauraceae ou Zingiberaceae), dans des poils sécréteurs (Lamiaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtaceae ou Rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Apiaceae ou Asteraceae). Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essences sont localisées dans les tissus internes.

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité Extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air. [71,72]

Les poils sécréteurs ou trichomes qui peuvent se présenter sous quatre formes: ils peuvent se composer de plusieurs cellules sécrétrices associées pour constituer un plateau porté par un pédicelle* court, poils peltés*, poils capités* à pieds court ou Lo ou bosselé. Les poils sécréteurs peuvent être externes ou bien internes, comme dans les divers eucalyptus ; Les trichomes glandulaires constituent un autre type de structure de sécrétion et/ou d'accumulation des CTV. Ces trichomes ont particulièrement été étudiés chez certaines familles botaniques telles que les Solanacées et les Lamiacées [73]

Les cellules épidermiques: il s'agit de cellules plus petites que les autres cellules épidermiques. Elles sont davantage perméables car leur paroi ne contient pas de cutine ; ce type de cellules se rencontre généralement dans les pétales de fleurs. Chez la rose.

Les poches sécrétrices: leur genèse débute par la division d'une cellule Parenchymateuse en quatre cellules, qui forment en leur centre une poche. Dès lors, il existe deux voies d'évolution pour cette poche: soit les cellules entourant la poche, continuent à se diviser tout en formant une seule rangée tout autour; la poche est qualifiée de schizogène ; soit les cellules, entourant la poche, vont se diviser et s'organiser pour constituer des rangées successives autour de la poche, avec un phénomène de lyse pour les cellules de la rangée la plus interne formant alors une poche schizolysigène

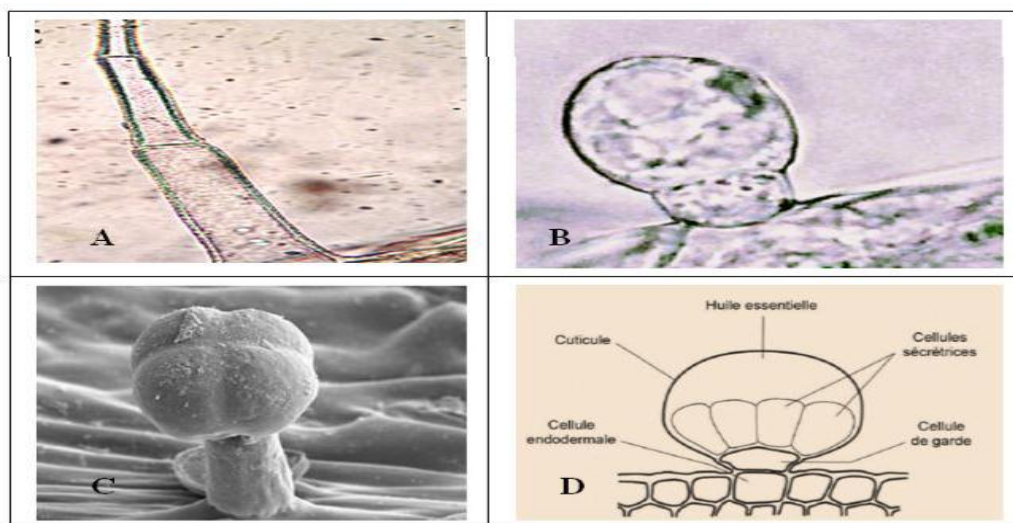


Figure I.5 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles. (A): poil sécréteur de *Mentha pulegium*, (B): trichome glandulaire de *Mentha pulegium*, (C): trichome glandulaire de *Lippia scaberrima* et (D): structure de trichome glandulaire de *Thymus*

I.2.4 Propriétés physico-chimiques

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène [74],[71]

- ✓ Les principales caractéristiques sont :
- ✓ Liquides à température ambiante.
- ✓ N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- ✓ Volatiles et très rarement colorées. [75]
- ✓ Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes. Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse.
- ✓ Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau. [76]

I.2.4.1 Propriétés physico-chimiques

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) étaient autre fois les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises. La qualité d'une huile essentielle et sa valeur sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques.

Densité :

La densité ou la masse volumique est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume, donc c'est le rapport du poids d'un certain volume d'un corps et le poids du même volume d'un corps de référence (eau).

Indice de réfraction :

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante [77]

L'indice de réfraction n'a pas d'unité car c'est le rapport de deux vitesses. Plus la lumière est ralentie, plus la matière a un indice de réfraction élevé.

L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement élevé. Il est supérieur à ceux de l'eau à 20°C = 1.3356, et de l'huile d'olive à 20°C = 1.4684. Ceci montre leur richesse en composants qui dévient la lumière polarisée.

Potentiel d'hydrogène :

L'abréviation de potentiel d'hydrogène est pH, 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.

Indice d'acide :

C'est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire pour la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. La teneur en acides libres des corps gras augmente avec le temps, l'indice d'acide permet donc de juger de leur état de détérioration. [77].

I.2.4.2 Analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles

Les propriétés physico-chimiques sont des indices propres constants d'une substance pure. Elles sont toujours mesurées, mais elles sont indiquées à titre indicatif, car la complexité des huiles essentielles ne permet pas de détecter les fraudes uniquement grâce à elles. L'analyse physico-chimique reste donc indispensable et la mieux adaptée pour connaître la composition exacte d'huile essentielle, et donc la plante de laquelle elle est extraite.

L'analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques et méthodes. Parmi ces méthodes nous parlons sur les méthodes micro-analytiques qui permettent l'identification et le dosage des produits même à l'état de traces. Ces méthodes consistent en l'utilisation des techniques de séparation et d'analyse des structures chimiques.

a. La chromatographie en phase gazeuse

Il s'agit d'une technique de chimie analytique qui permet de séparer des composés volatils ou volatilisables sans dégradation (non-thermolabiles). Son pouvoir de séparation dépasse celui de toutes les autres techniques, du moins pour les huiles essentielles.

La chromatographie en phase gazeuse CPG est une technique très répandue. Elle possède plusieurs avantages : sensibilité, polyvalence, rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent plus son intérêt [78]

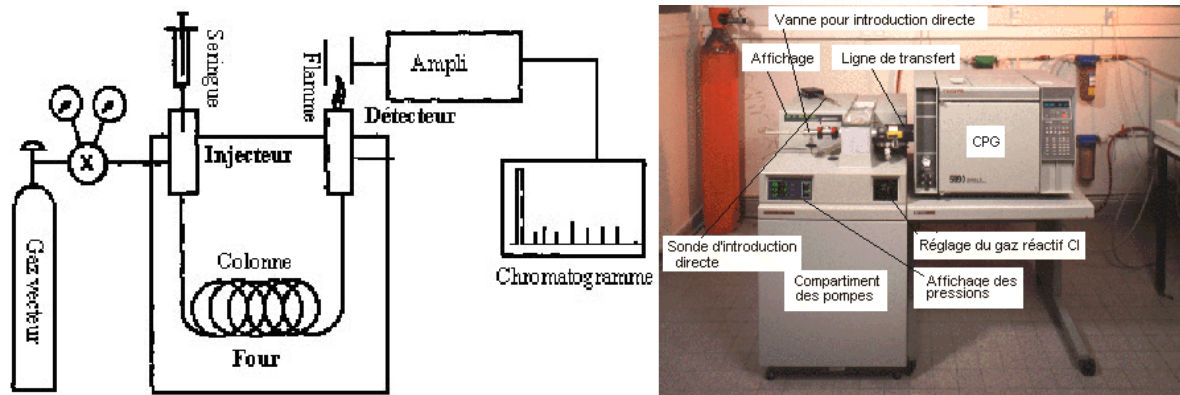


Figure I.6 : Appareillage pour une CPG

La technique a été perfectionnée et permet maintenant de séparer les constituants des mélanges très complexes contenant jusqu'à 200 composés [79]. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules [80].

b. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (mass spectrometry ou MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de

caractériser leur structure chimique.

Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le spectromètre de masse est souvent couplé avec un système de chromatographie en phase gazeuse, et cette association, d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification, permet d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces (quelques nano grammes de mélange).

Le principe de la spectrométrie de masse est le suivant :

✓ Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique à 70 eV. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé.

✓ Il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés.

✓ Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur.

✓ L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire

c. Analyse par couplage GC/MS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. La méthode est basée sur la séparation des constituants à l'aide de la CPG et leur identification par le biais de la SM.

La chromatographie en phase gazeuse sépare des fractions moléculaires composant l'échantillon en se basant sur la vitesse de déplacement et le temps de rétention mis pour parcourir une colonne remplie d'une phase stationnaire. La spectroscopie de masse utilise des sources énergétiques pour ioniser, fragmenter et enfin séparer les groupements moléculaires selon le rapport masse/charge électrique (m/q).

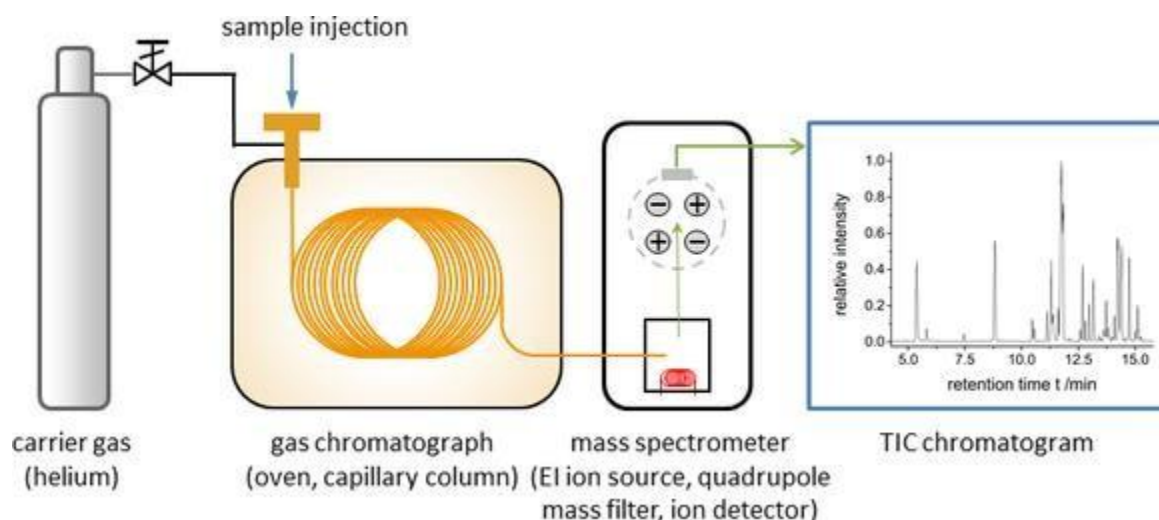


Figure I.7 : Schéma de couplage CPG/SM

La combinaison de ces deux techniques d'analyses CPG/SM permet de séparer les composants de l'échantillon et d'identifier chaque composant, donc de faire une analyse complète aussi bien qualitative que quantitative du produit à analyser. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (I_r) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. L'avantage d'un couplage en chaîne d'une interface chromatographique avec un spectromètre est la possibilité d'analyser le spectre individuel d'un composé. Il s'agit de la technique la plus utilisée pour l'analyse des huiles essentielles en raison en grande partie de la facilité de prise en main des systèmes de séparation et de détection performants, avec un coût relativement faible.

I.2.5 Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'HE représente de 0,1 à 3 % du poids sec des plantes aromatiques. Une grande variété de méthodes d'extraction est utilisée commercialement pour isoler les HEs à partir du matériel végétal. Les méthodes traditionnelles et commerciales utilisées pour extraire les HEs sont :

[81] (Figure : I.8).

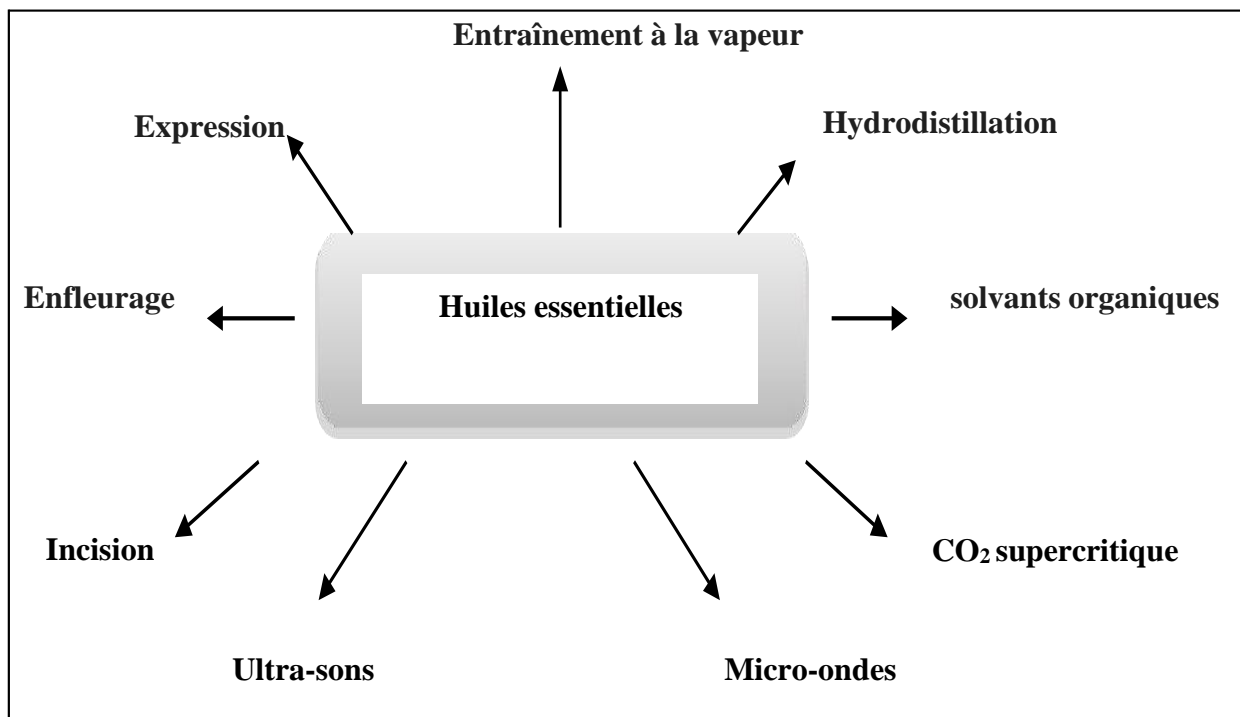


Figure I.8 : Modes d'extraction des huiles essentielles [82].

L'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation constituent les procédés d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques les plus anciens, apportés par les Arabes au IX^{ème} siècle. Cette opération s'accomplit traditionnellement dans un alambic [83].

I.2.5.1 Distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par leur vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures [84]. Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau [85].

Tout d'abord, l'**hydrodistillation** (*water distillation*). Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à

ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat [86].

Cette technique a été appliquée dans de nombreux travaux [87_89].

Vient ensuite, la **distillation par entraînement à la vapeur d'eau** (*steam distillation*). Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée à travers de 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 : le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante [84]. Cette méthode est industriellement la plus utilisée pour l'extraction huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* dans le but d'obtenir un bon rendement de l'essence et de réduire le temps d'extraction [90].



Figure I.9 : Montage d'extraction par la technique d'hydrodistillation [91]

I.2.5.2 Entraînement à la vapeur d'eau

C'est la technique la plus couramment utilisée pour la fabrication des HEs. C'est la seule distillation préconisée par la Pharmacopée française, car elle minimise les altérations hydrolytiques (notamment des esters). Dans cette méthode, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. Cette opération s'accomplit dans un alambic. Un flux de vapeur d'eau traverse une cuve remplie de plantes aromatiques disposées sur des plaques perforées. Le but consiste à emporter avec la vapeur d'eau, les constituants volatils de la plante aromatique [92].

Les huiles essentielles sont généralement obtenues par distillation et entraînement à la vapeur d'eau, cette opération s'accomplit dans un distillateur. Le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Ce courant de vapeur entraîne les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile essentielle et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat [93]. Les méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'essence se libère du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau. Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation [71] (Figure I.10).

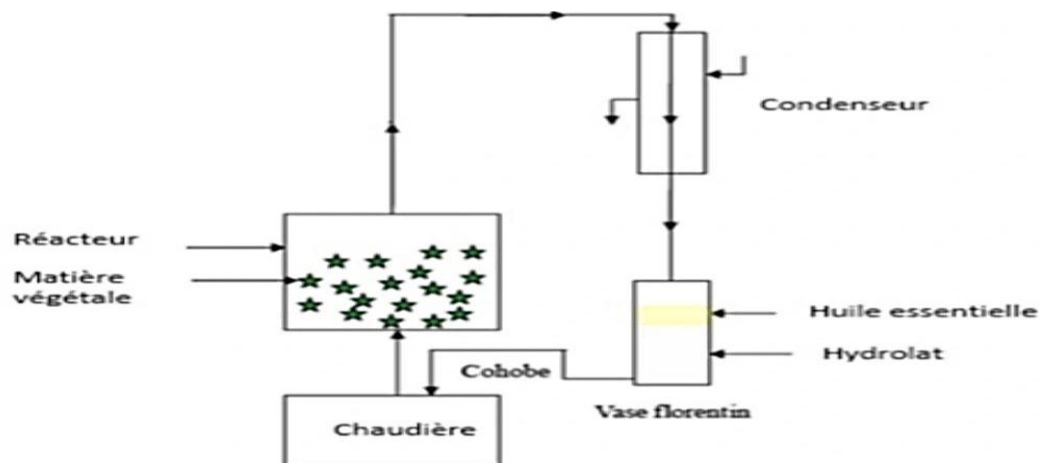


Figure I.10 : Principe schématisé de l'extraction par entraînement à la vapeur (EVE)

[94]

I.2.5.3 Extraction par le CO₂ à l'état supercritique

Ce procédé est basé sur le fait que le CO₂ dans des conditions dites critiques (fortes pressions) présente un pouvoir de dissolution accru vis-à-vis de divers composés tels que les HE, les arômes et les colorants . . . [95].

Cette méthode utilisée d'abord en brasserie pour obtenir des extraits de houblon, semblait à priori intéressante d'une part pour augmenter le rendement d'extraction, d'autre part le CO₂

s'évaporant complètement ne laissait aucune trace toxique dans l'huile essentielle. Elle trouve un intérêt tout particulier au niveau des produits naturels, car elle conduit à des extraits « cœur de la nature » souvent très proches de l'odeur de la matière première traitée et exempts de solvants organiques [96].

Grâce aux caractéristiques du CO₂ à l'état supercritique, en particulier celle d'être un solvant à « géométrie variable », nous pouvons donc obtenir à basse pression des extraits dont la composition est de type « huile essentielle », à haute pression des extraits dont la composition est de type « concrète ». Evidemment selon les conditions opératoires, on peut en théorie obtenir tous les extraits intermédiaires [96].

Extraction par CO₂ supercritique

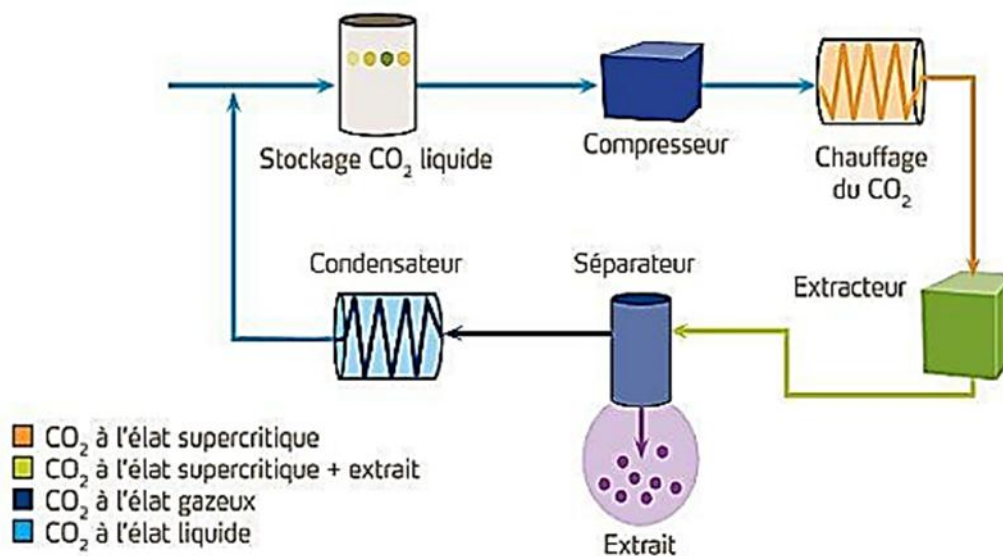


Figure I.11. Schéma simplifié d'une opération d'extraction au CO₂ avec séparation par détente [97]

I.2.5.4 Hydrodiffusion :

L'hydro diffusion consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale, du haut vers le bas [98]. La condensation du mélange de vapeur contenant l'huile se produit sous la grille retenant la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. De plus, l'hydrodiffusion

permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur (Figure I.12) [38]

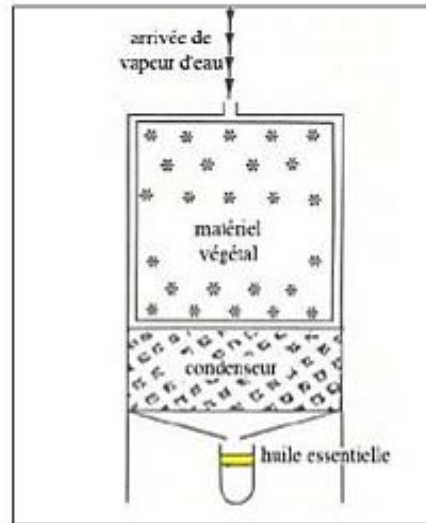


Figure I .12 Hydrodiffusion [38]

I.2.5.5 Extraction par micro-ondes :

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide. Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. [99]

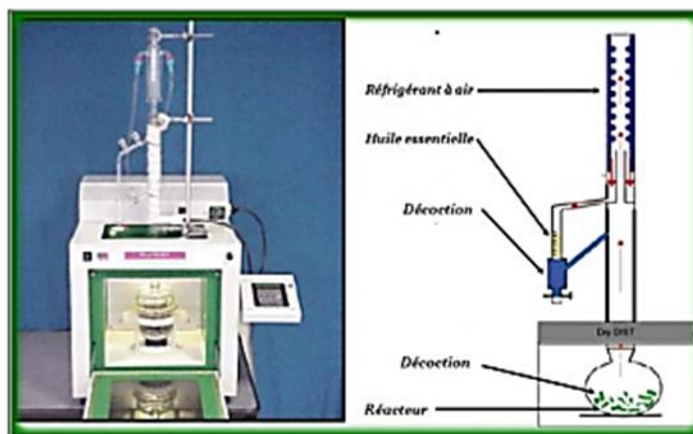


Figure I.13 : Dispositif d'extraction assistée par micro-ondes [100]

I.2.5.6 Expression à froid : [101]

Les huiles essentielles de fruits d'hespéridés ou encore d'agrumes ont une très grande importance dans l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes.

C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique, qui est l'expression à froid.

Le principe de cette technique est basé sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois.

Alors que jusqu'à une époque récente, l'huile essentielle constituait le produit majeur obtenu à partir des fruits de Citrus, désormais c'est le jus qui représente le produit le plus important, l'huile essentielle étant devenue un sous-produit de la production de jus de fruits d'agrumes. De plus l'expression de type manuel dite « à l'éponge » a laissé place à des procédés beaucoup plus industrialisés et mécanisés afin de diminuer les coûts, d'augmenter les rendements et de préserver le fruit en vue de l'extraction de son jus. Cependant l'utilisation de grande quantité d'eau dans la majeure partie de ces procédés peut altérer les qualités des huiles essentielles par dissolution des composés oxygénés, par hydrolyse et par transport de microorganismes. C'est pourquoi les constructeurs cherchent en permanence à s'affranchir de l'utilisation de l'eau lors de telle extraction.

L'extracteur est une machine permettant l'expression à froid de l'huile essentielle des hespéridés sans emploi d'eau, ce qui évite ainsi des altérations telles les hydrolyses ou les solubilisations des certaines classes de composés aromatiques.

Le principe de cette machine est basé sur l'ouverture des sacs oléifères par éclatement sous l'effet d'une dépression.

La sfumatrice provoque la libération de l'huile essentielle des sacs oléifères au moyen de zones de vibrations ce qui a pour effet de restituer de façon intacte l'écorce de fruit (sans traces de blessures). L'huile essentielle est ensuite entraînée par un jet d'eau avant d'être séparée de la phase aqueuse par centrifugation.

La machine d'extraction « in line », relativement complexe, permet à la fois l'extraction du jus et de l'huile essentielle du fruit sans que ces deux produits soient en contact.

I.2.5.7 L'extraction par solvants volatils :

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Après une dernière concentration, on obtient une « absolue ». Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de l'eau ou de la vapeur d'eau. Du fait de l'utilisation de solvants organiques, cette technique présente toutefois des inconvénients qu'il est important de noter. En effet, l'intervention de solvants organiques peut entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contamination de l'échantillon par des impuretés parfois difficile à éliminer. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. Parmi les solvants les plus utilisés, on recense: le méthanol, l'éthanol, l'éther de pétrole ou encore le dichlorométhane. Cependant, depuis quelques décennies, l'extraction par solvant a connu d'intéressantes améliorations. L'hydrodistillation-extraction simultanée et l'extraction par Soxhlet sont les principales. [75]

L'extraction par l'appareil de Soxhlet consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisque distillé à chaque cycle. Cette technique est loin d'être exclusive aux molécules aromatiques d'origine végétale. Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction de lipides, ou de diverses autres catégories de molécules. De plus, cette technique d'extraction a été récemment combinée aux microondes et aux ultra-sons.

L'extraction par les solvants volatils

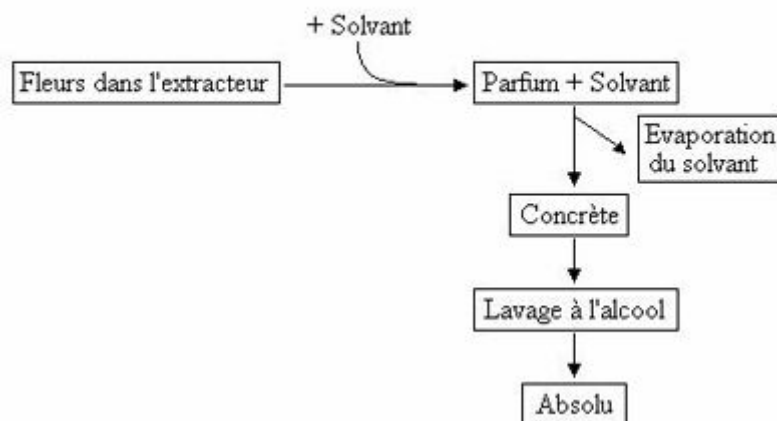


Figure I .14 : L'extraction par solvants volatils [94].

I.2.5.8 Autres méthodes d'obtention de l'huile essentielle

a) Expression mécanique à froid

Ce mode d'obtention particulier est réalisé uniquement pour les fruits de la famille botanique des Rutaceae (citron, orange, bergamote, mandarine, etc.). C'est une méthode simple qui consiste à briser mécaniquement par abrasion les poches oléifères localisées au niveau de l'écorce ou du péricarpe du fruit pour en recueillir le contenu[102]. L'huile essentielle est séparée du jus de fruit par un procédé mécanique de décantation à froid. De nos jours, l'expression mécanique reste le procédé le plus simple et le seul ne modifiant pas le produit obtenu. Ainsi, l'HE recueillie porte le nom d'essence. Le produit obtenu ne subissant pas de modifications, les essences obtenues par extraction mécanique possèdent une activité thérapeutique nettement supérieure à celle des HE produites par d'autres procédés. En effet, contrairement aux HE uniquement constituées de molécules volatiles, les essences, quant à elles, renferment des composés non volatiles comme des flavonoïdes ou encore des stéroïdes [103].



Figure I.15 : Expression mécanique à froid

b) L'enfleurage

Dans cette technique, les végétaux, en général les fleurs, sont mis en contact avec un corps gras (axonge) qui se sature d'huile essentielle. Le corps gras est ensuite épuisé par un solvant puis évaporé sous vide [104]

I.2.6 Composition chimique des huiles essentielles

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés est d'environ des milliers et il en reste beaucoup à découvrir. Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils [6].

I.2.6.1 Terpènes et terpénoïdes

a) Les terpènes

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%). selon le mode de couplage « tête-queue » Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales [103]

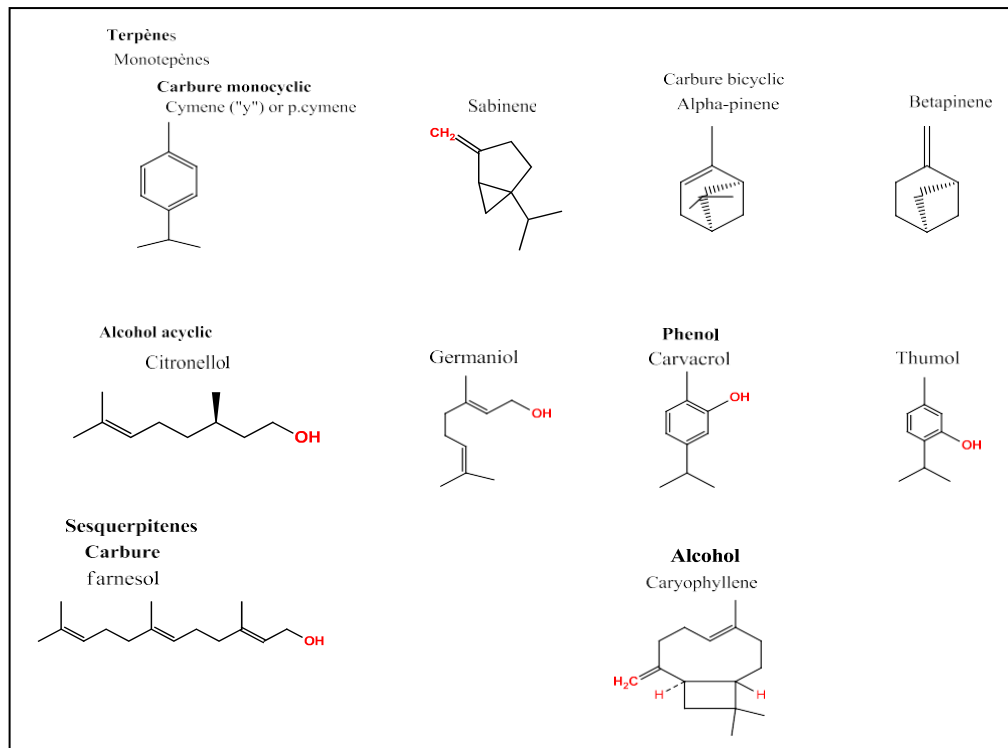


Figure I.16 : Exemples de Structure chimique de terpènes

b) Les terpénoïdes

Les composés de type terpénique sont largement rencontrés dans les huiles essentielles, ils sont formés d'un multiple pair ou impair d'unités de 2-méthylbuta-1,3-diène ou appelé encore isoprène (C₅H₈).

On distingue ainsi selon le nombre d'entités isoprènes le groupe des monoterpènes (C₁₀H₁₆), les sesquiterpènes (C₁₅H₂₄), les diterpènes (C₂₀H₃₂), les tétraterpènes de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes et les polyterpènes (C₅H₈) n où n peut-être de 9 à 30[105].

I.2.6.2 Les composés aromatiques

Le groupe des composés aromatiques renferme les molécules de parfum comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol et l'estragol. Ces composés sont abondants dans les huiles essentielles des Apiaceae (Anis, Fenouil, Cannelle, Basilic). [106.]

I.2.6.3 Composés d'origine diverses :

Il existe un nombre non négligeable de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles issus soit de la dégradation des terpènes non volatils qui proviennent de l'auto-oxydation par exemple des carotènes ou des acides gras comme les acides linoléiques et α -linoléique en (3-cis hexanol, décanal, β -ionone [6].

I.2.7 Les activités biologiques des huiles essentielles

I.2.7.1 Activités antibactériennes

Les qualités antibactériennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Ces propriétés sont dues à la fraction des huiles essentielles contenues dans les plantes [107].

Les huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae* : l'Origan, le thym, la sauge, le romarin, clou de girofle sont autant de plantes aromatiques fréquemment utilisés comme ingrédients alimentaires. Les huiles essentielles de ces plantes ont toutes une particularité commune : elles sont riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces trois composés possèdent une forte activité antibactérienne contre un large spectre de bactéries : *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogene*, *Salmonella enterica*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus sake*, *Satphylococcus aureus* et *Helicobacter pyroli* [108].

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé [109].

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire [110]. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des huiles essentielles ait son propre mécanisme d'action. Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane

de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane ([111],[110]).

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

- ✓ Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- ✓ Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- ✓ Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie [112]

I.2.7.2 Activités antioxydants :

La recherche de nouveaux antioxydants à partir de matières végétales a pris une très grande attention dans ces dernières décennies. L'utilisation des antioxydants synthétiques dans les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques est suspectée à long terme d'effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes.

Plusieurs limites et restrictions ont été mises en place concernant leur utilisation, leur substitution par des antioxydants naturels s'avère primordial. Les plantes sont une source des antioxydants naturels. Ces derniers sont apparus comme alternatifs aux antioxydants synthétiques, et ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs [107].

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats [113].

Les antioxydants sont des composés naturels ou synthétiques qui permettent de ralentir le phénomène d'oxydation et protéger le système cellulaire contre les effets des processus potentiellement nocifs qui causent l'oxydation excessive, en particulier, ils stabilisent les radicaux libres et les empêchent de poursuivre leur œuvre de destruction.

Ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dériver ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires.

I.2.7.3 Activités inflammatoires :

Un anti-inflammatoire est un médicament qui agit sur les conséquences physiopathologiques de la réaction inflammatoire quelle qu'en soit l'origine. [114]. On en distingue deux grands groupes les antiinflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS), dont les cibles pharmacodynamiques sont différents. [115].

I.2.8 .Conservation et étiquetage des huiles essentielles

I.2.8.1. Conservation

Il est possible de réduire l'instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles 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 basses température, ou conservés sous atmosphère d'azote. On peut également recourir à l'adjonction d'autres antioxydants [116]-[117]

I.2.8.2. Etiquetage

Les informations qui doivent figurer sur l'étiquète sont les suivantes [118] :

- ✓ Nom scientifique et vernaculaire de la plante.
- ✓ La partie de la plante utilisée.
- ✓ L'origine de la plante ou lieu de production.
- ✓ Mode d'obtention de l'HE.
- ✓ La variété et le chémotype s'il existe.
- ✓ Numéro de lot, date de production et date de péremption.
- ✓ Nom, adresse et numéro de téléphone du fournisseur .

I.2.9 Application médicale des HEs

En raison de leurs diverses propriétés, les huiles essentielles sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance. En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie par leurs pouvoirs, antispasmodique, antidiabétique, analgésique, apéritif, antiseptique..., en alimentation par leur activité antioxydante et leur effet aromatisant, en parfumerie et en cosmétique par leur propriété odoriférante.

I.2.9.1 En pharmacie

Les essences issues des plantes sont utilisées en grande partie dans la préparation d'infusion (menthe, verveine, thym...) et sous la forme de préparations galéniques. Plus de 40% de médicaments sont à base de composants actifs de plantes, par exemple gastralgine est un digestif antiacide qui se compose d'huile essentielle de carvi.

De même, elles permettent par leurs propriétés aromatisants de masquer l'odeur désagréable de médicaments absorbés par voie orale. Aussi beaucoup de médicaments vendus en pharmacie sont à base des huiles essentielles comme par exemple les collyres (goute), les crèmes, ... [119]



Figure I.17 : Des médicaments à base d'HE [120]

I.2.9.2 En parfumerie et cosmétologie

Les d'huile essentielle sont recherchées dans l'industrie des parfums et des cosmétiques en raison de leurs propriétés odoriférantes. L'industrie de la parfumerie consomme d'importants tonnages d'essences (60%) en particulier celles de rose, de jasmin, de violette, de verveine... Les d'huile essentielle sont aussi consommées en cosmétologie pour parfumer les produits cosmétiques : les dentifrices, les shampoings, les crèmes solaires, les rouges à lèvres, les savons, etc.... [121]

Les produits d'hygiène, détergents et lessives par exemple, consomment eux aussi beaucoup des huiles essentielles pour masquer les odeurs (souvent peu agréables) des produits purs



Figure I.18 : utilisation d'HE dans la cosmétique

I.2.9.3 Dans les industries agro-alimentaires

En vertu de leurs propriétés antiseptiques et aromatisants, les huiles essentielles sont employées quotidiennement dans les préparations culinaires (ail, laurier, thym...). Elles sont également très prisées en boissons anisées et en confiserie (bonbons, chocolat...). Leur pouvoir antioxydant leur permet de conserver les aliments en évitant les moisissures, conservation par exemple par le thym et le romarin [122].

I.2.9.4 Aromathérapie

Dans notre société moderne, la médecine courante, d'orientation allopathique, se trouve confrontée à des problèmes majeurs : l'inefficacité des antibiotiques face à certains germes pathogènes devenus résistants, le manque de substances antivirales, l'augmentation des déficiences immunitaires des individus, le cercle vicieux auquel aboutit la prescription continue de médicaments psychotropes [123]

L'aromathérapie propose des solutions alternatives à ces problèmes. Alors que les microbes deviennent de plus en plus résistants aux structures moléculaires de synthèse des antibiotiques, ils se heurtent plus difficilement à l'infinie diversité et à la complexité des HE [124]. Elles apportent à l'organisme, les concentrés de la nature les plus précieux pour rétablir ou conserver l'équilibre indispensable à la santé [125].

I.2.9.5 En dentisterie :

Grâce à leurs propriétés aromatisants et antiseptiques, les HEs ont été largement utilisées dans les bains de bouche conçus pour l'hygiène buccodentaire. Les préparations à base du Thymol, d'Eucalyptol et du Menthol sont parmi les plus utilisées depuis longtemps dans le monde, surtout aux États-Unis. Cependant, c'est juste en 1987 que les bains de bouche préparés à base d'HEs ont été approuvés par l'association dentaire américaine (ADA), attribuer à leur efficacité antimicrobienne et leur sûreté. Parmi les bains de bouche les plus connus au monde, on donne l'exemple de la Listerine® qui est une solution constituée d'HE de Thymol et d'Eucalyptol utilisée pour le lavage de la cavité orale et les dents[126]

I.2.9.6 Diverses industries :

L'industrie chimique est le principal utilisateur des isolats issus des huiles essentielles comme matières premières pour la synthèse de principe actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes, exemple : pinènes, sclaréol, linalol, citronellal, citral eugénol, safrol, ect... [127].

Tableau I .4: Exemples de la diversité d'applications des huiles essentielles [128]

Huiles Essentielles	Parfumerie		Alimentatio	Médecine
	Cosmétique	Technique		
Basilic	Perfume		Arome pour sauces et condiments	Antispasmodi querégulateur du Système
Citronnelle		Arome pour savons, désinfectant, éloigne les Insects	Arome pour boissons et sucreries	

Eucalyptus			Arome pour boisson, sucreries, crème Glacées	Anti- inflammatoire
Géranium	Perfume		Arome pour sucreries, chewing- Gum	Antispasmodi- que , relaxant
Menthepoivrée		Saveur pour dentifrice	Saveur pour liqueurs, glaces, chewing- gum, Chocolat	Antalgique, anesthésique, tonique, stimulant du système nerveux

I.2.10 Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits à risque. La toxicité provient de la présence de certaines molécules aromatiques pour lesquelles des risques ont été identifiés suite à des tests

- **la famille des cétones** : (une neurotoxicité et un risque abortif)
- **la famille des phénols et des aldéhydes** : (dermocausticité, hépatotoxicité, irritation des muqueuses respiratoires, déclenchement de crises d'asthmes),
- **la famille des furocoumarines et pyrocoumarines** : (réactions érythémateuses sous l'effet prolongé du soleil),
- **la famille des monoterpènes** : (enflamme et détériorer, les néphrons) [22].

Dans le monde actuel des produits naturels, il convient de ne pas utiliser ces substances de façon abusive. Comme pour un médicament, il existe pour chaque huile essentielle un équilibre entre le bénéfique et le risque qui doit aussi être envisagé en fonction du sujet [129].



Chapitre II

Matériels et méthodes



II.1 Introduction

Notre travail a été réalisé au laboratoire de génie des procédés de l'Université Djilali BOUNAAMA de Khemis Miliana et au laboratoire d'analyse ZIBOUCHE de Ain Defla. Notre travail a pour objectif de contribuer à l'étude de l'extraction et la caractérisation physico-chimique et les activités biologique (antibactériens, antioxydant et antiinflammatoire)l'huile essentielle de *thymus* (thym) de la région d'Ain Defla. Pour cela, nous avons suivis différentes étapes qui sont résumées par la **figure II.1**.

Les lieux où ont été réalisés les différentes tâches de notre travail sont regroupés dans le **tableau II.1**.

Tableau II. 1. Lieu et tâches effectuées

Lieu de travail		Laboratoire	Travail expérimental
Université Djilali BOUNAAMA khemis Miliana	Faculté ST	Laboratoire de génie des procédés	Extraction de l'HE et l'étude des propriétés physico-chimiques
		Laboratoire d'analyse	Etude de l'effet antioxydant Etude de l'effet anti-inflammatoire
Ain Defla	Laboratoire des analyses médicales du Dr ZIBOUCHE	Laboratoire microbiologique	Etude de l'activité antibactérienne
Tipaza	Centre de recherche Scientifique et technique en Analyse Physico-Chimiques	Labo de recherche GC/MS	L'analyse GC/MS d'HE

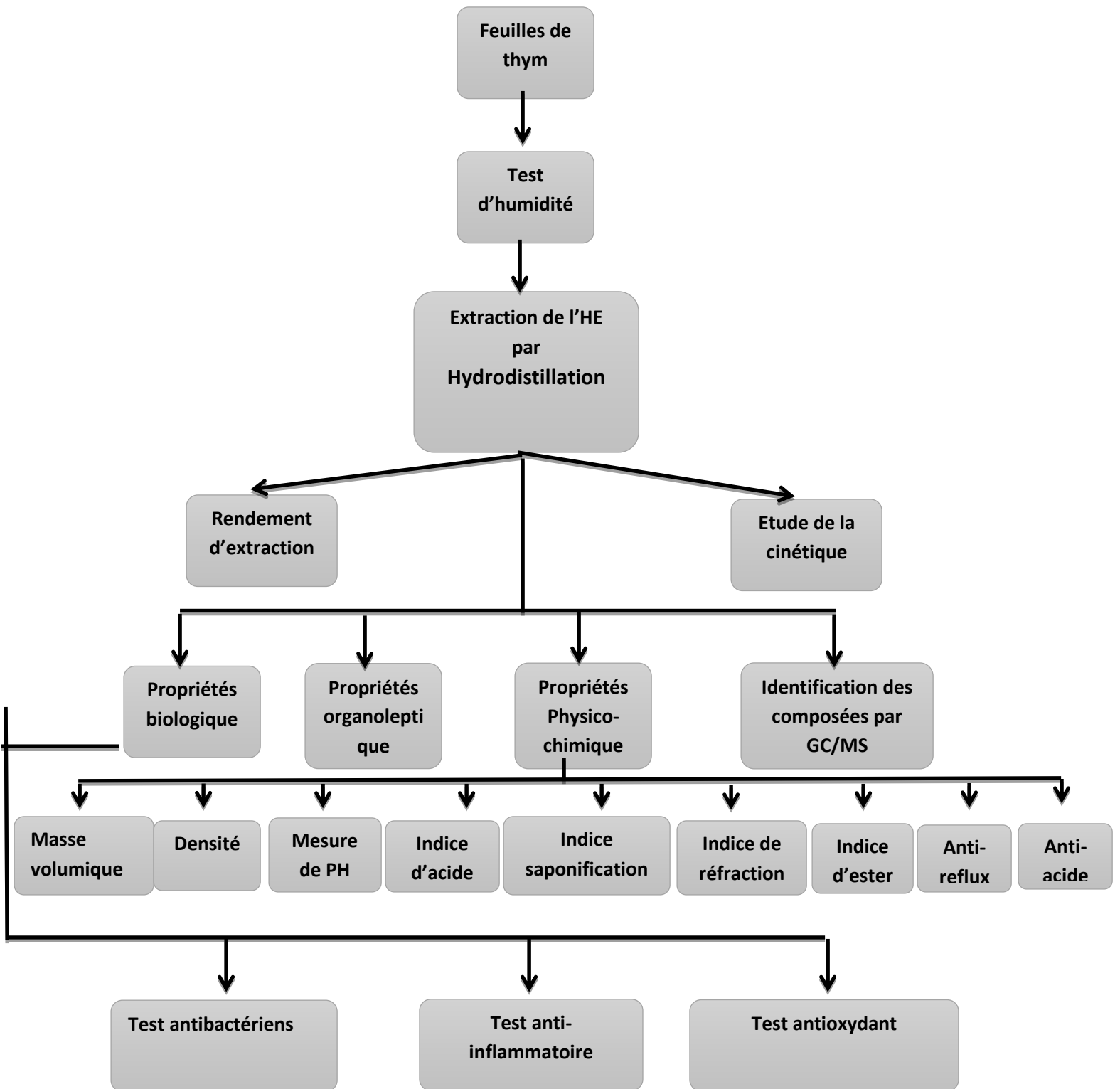


Figure II.1 : Diagramme général de la procédure expérimentale

II.2 Matériels et méthodes

II.2.1. Matériel utilisé

II.2.1.1. Appareillage utilisé

Tableau II. 2. Liste d'appareillages, de verreries et de produits utilisés dans notre étude expérimentale.

Appareils	Verreries	Produits utilisés
Autoclave	Ballon 1000ml	Huile de thym
Bain marie	Béchers	Phénolphtalléine
Balance de précision	Boîtes de pétri	Eau distillée
Chauffe ballon	Disques d'ATB	Ethanol
Appareil GC/MS	Ecouvillons	Eau physiologique
Hydrodistillateur de type	Eppendorfs	Vitamine C
Clevenger	Eprouvettes	1,1-Diphényl-2
Incubateur	Erlenmeyers	picrylhydrazyl
Réfrigérateur	Fioles	(DPPH)
Réfractomètre	Flacon en verre	Hydroxyde de potassium
pH mètre	Gants	(KOH)
Agitateur magnétique	Micropipette	Acide chlorhydrique (HCl)
		Diméthyle sulfoxyde
		(DMSO)
		Aspirine
		diclofenac

II.2.1.2. Matériel végétal

La plante qui a fait l'objet de notre étude est le *Thymus algériensis*. Cette espèce est très répandue en Algérie. Dans notre cas, nous avons étudié le thym qui provient de la commune de khemis miliana dans la wilaya d'Ain Defla. Il a été cueilli au mois d'avril.

L'extraction de l'huile essentielle est réalisée à partir des feuilles fraîches et sèches de thym

II.2.1.3 Séchage de la plante

Les feuilles de thym fraîches sont rincées plusieurs fois avec de l'eau de robinet puis à l'eau distillée, elles sont ensuite séchées pendant 8 jours à l'air libre et à l'ombre puis stockées à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

II.2.2 Méthodes

II.2.2.1 Extraction par l'hydrodistillation

L'hydrodistillation est réalisée avec un extracteur de type clewenger.

II.2.2.1.1. Montage de l'hydrodistillation

Le chauffe-ballon est placé sur un support élévateur en position haute. Le système refroidissant est fixé à un support à l'aide d'une pince et d'une noix et à son extrémité est placé une allonge de distillation. On utilise des clips pour maintenir assemblées les deux pièces en verre (**Figure.II.2**).

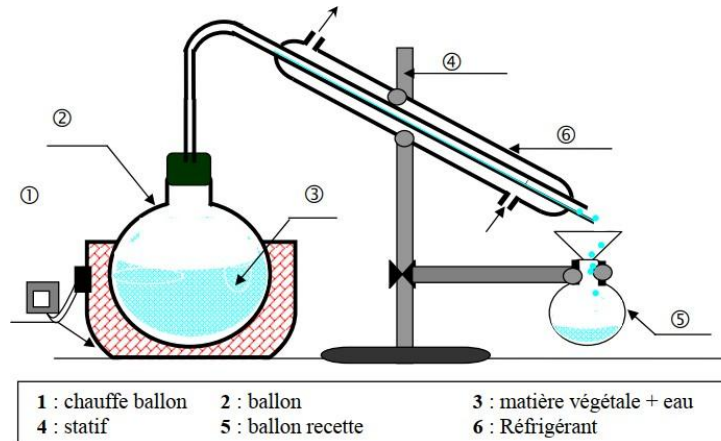




Figure.II.2 : Montage d'hydrodistillation.

II.2.2.1.2 Protocole d'extraction

On pèse 30g de feuilles de Thym séchées et écrasées dans un ballon de 1L, on ajoute 750ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition à l'aide du chauffe ballon pendant 3 h.

Les vapeurs chargées d'huile essentielle traversent le serpentin de refroidissement et se condensent. Puis elles sont récupérées dans une ampoule à décanter. Deux phases se forment :

- Une phase organique : elle est huileuse et très parfumée, c'est l'huile essentielle.
- Une phase aqueuse : l'hydrolat ou l'eau aromatique, elle est légèrement parfumée et contient les mêmes composés que l'EH mais en très petite quantité.

II.2.2.1.3 Conservation de l'huile essentielle

Les HE sont sensibles à la température et à la lumière. C'est pour cela qu'on a conservé notre huile à une température voisine de 4°C et à l'abri de la lumière, enveloppée de papier d'aluminium, jusqu'à son usage pour éviter toute dégradation.

II.2.2.2 Détermination du Rendement d'extraction :

Le rendement en huile essentielle (RHE), est défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenue après extraction (Me) et la masse de la matière végétale utilisée (Mv). Il est donné par la formule suivante :

Formule II.1

$$R\% = \frac{Me}{Mv} \times 100$$

R%: Rendement en %.

Me : Masse d'huile essentielle extrait.

Mv : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

Le rendement enregistré pour l'huile essentielle de l'espèce *Thym* en Algérie et dans différentes régions du monde est donné dans **le tableau II.3**.

Tableau II.3 : Rendements de l'HE de *Thym* en Algérie et dans différentes régions du monde

Rendement (%)	Origine	Références
4.2	Algérie (Tlemcen)	[17]
2.2	Algérie (Mostaganem)	[17]
1.15	Algérie (M'Sila)	[16]
1.58	Algérie (Blida)	[60]
2	Algérie (Relizane)	[130]
1.31	Algérie (Chlef)	[14]
1.12	Algérie (Tizi Ouzou)	[131]
2.7	Algérie (Ain Defla)	[48]

1.42	Algérie (Setif)	[132]
1.18	Algérie (Tiaret)	[133]
0.9	Cameroun	[134]
1.6	Turquie	[135]
1	Maroc	[136]
0.5	Maroc	[137]
1.6	France	[138]
0.25	Brésil	[139]
1	Serbie	[138]

II.2.2.3 Détermination du Taux d'humidité

Le terme « taux d'humidité » correspond à la teneur en eau (sous forme liquide ou vapeur) de l'air ou d'une substance.

Un échantillon de 150g de feuilles de thym est disposé pour être séchée à l'air libre. Par la suite l'échantillon susmentionné est pesé de manière quotidienne jusqu'à atteindre une masse finale constante. La différence entre la masse finale et la masse initiale représente la quantité d'eau contenue initialement dans l'échantillon utilisé.

Le taux d'humidité est estimé par la **formule II.2** :

$$H\% = [(m_f - m_s) / m_f] \times 100 \quad (\text{Formule II.2})$$

Où :

m_f : poids frais de l'échantillon (g).

m_s : poids sec de l'échantillon (g).

H (%) : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

II.2.2.4 Etude de la cinétique d'extraction

L'étude de la cinétique d'extraction a pour but de déterminer le temps nécessaire au bout duquel il n'est plus rentable de poursuivre l'extraction, qualifié par le rendement optimum. Pour cela et afin d'illustrer la cinétique d'extraction de l'huile essentielle de *Thym* par hydrodistillation à l'aide du montage du type « *Clevenger* » décrit précédemment, on a suivi la variation de la masse d'huile essentielle en fonction de temps jusqu'à l'extraction totale d'huile essentielle.

II.3 Caractérisation d'huile essentielle de thym

II.3.1 Analyse physique

II.3.1.1 Caractéristiques organoleptiques de l'HE de thym

L'évaluation des propriétés organoleptiques de l'HE de thym a été effectuée en observant et en inhalant directement l'huile essentielle. Ainsi, l'odeur, la couleur et l'aspect de notre HE ont été déterminés.

II.3.1.2. Détermination des propriétés physico-chimiques

Tableau II.4: Caractéristiques physicochimiques de l'HE de thym

Caractéristiques physico chimiques					
Densité	Indice d'acide	Indice de Réfraction	PH	Régions	Références
0,912	3,330	1,467	/	Algérie(Chlef)	[14]
1.05	9,25	1,503	6	Algérie (Ain Defla)	[140]
/	/	1,504	/	Algérie (Tizi Ouzou)	[131]
0,79	2,24	1,503	6	Algérie(M'sila)	[16]
0,910 -0,935	4,1-5,2	1,495-1,505	/	/	AFNOR, 1989

La densité relative

La densité relative d'une HE est définie par le rapport de la masse volumique de l'HE par rapport à la masse volumique de l'eau. On pèse un flacon propre et vide, puis on pèse le flacon rempli d'eau distillée. Après séchage on pèse le même flacon rempli d'HE de thym. La densité relative est exprimée par la relation suivante :

$$d = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \quad \text{Formule II. 3}$$

Avec :

m0 : masse en g du tube vide ;

m1 : masse en g du tube rempli d'eau distillée

m2 : masse en g du tube rempli d'HE de thym

d : la valeur de la densité relative

Indice de réfraction

La mesure de l'indice de réfraction de notre huile a été effectuée à l'aide d'un réfractomètre de marque ABBE (**figure II. 3**). Après étalonnage et nettoyage de l'appareil à l'aide d'une substance d'indice de réfraction connu à la température fixée à 20°C, on place 2 gouttes d'huile essentielle au milieu du prisme. Puis on regarde dans l'oculaire et la mesure se fait en tournant le bouton de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule, enfin on note la valeur de l'indice par l'échelle de lecture. l'indice de réfraction d'un liquide à 20°C est évalué par la formule suivante :

$$I_r = I_t + 0.00045 (T-20) \quad \text{Formule II.4}$$

Avec :

I_{r20}=Indice à 20°C

I_t =Indice à la température de mesure

T = Température de mesure



Figure II .3 : Réfractomètre d'Abbe

✚ Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH ou « potentiel hydrogène » mesure l'activité chimique des ions hydrogènes H^+ en solution. Le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Le pH de notre HE est mesuré à l'aide de papier pH.

✚ La masse volumique

La masse volumique est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume, elle est calculée selon la **formule II.5 [143]**

$$\rho = \frac{m}{V}$$

Formule II.5

ρ : masse volumique (g /ml)

m : masse de l'huile (g).

V : volume d'huile (ml).

II.3.2 Analyses chimiques

II.3.2.1 L'indice d'acide (IA)

L'indice d'acide est la masse d'hydroxyde de potassium (KOH), exprimée en milligrammes, nécessaire pour neutraliser l'acidité libre contenue dans un gramme de substance.

Le principe consiste à neutraliser des acides libres par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée.

▪ **Protocole expérimentale :**

On introduit 0.5g de l'HE dans un bécher. On ajoute 5 ml d'éthanol 95% neutralisé et 5 gouttes au maximum d'indicateur, soit la solution de Phénolphthaléine. . Puis on titre ce liquide avec une solution de KOH (0.1N) jusqu'à ce que le mélange vire au rose. Le calcul de l'indice d'acide se fait par la formule suivant:

$$Ia = (M \times N \times V) / m$$

Formule II.6

$$Ia = (5,61 \cdot V_{KOH}) / m$$

Formule II.7

Avec :

Ia: indice d'acide

V_{KOH} : volume de KOH versé (ml)

M : masse de KOH (g)

m : masse d'HE (g)

N : molarité de KOH

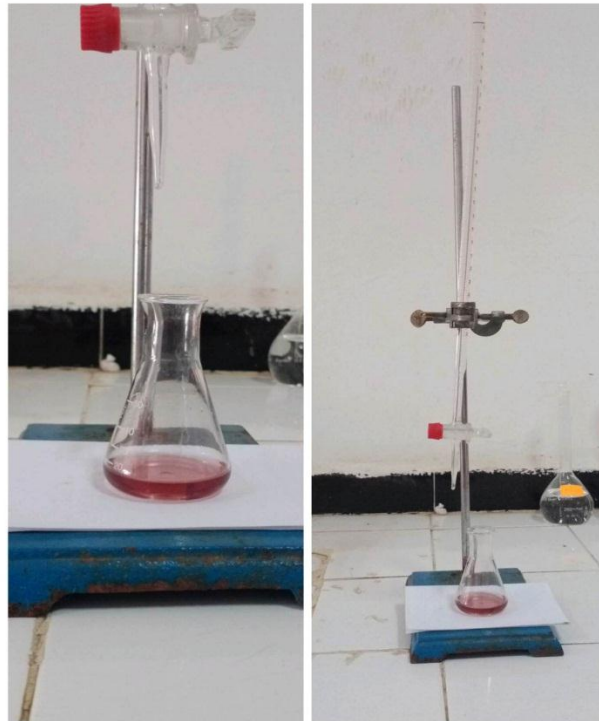


Figure II.4 . Photo représentant la détermination de l'indice d'acide

II.3.2.2 Indice de saponification :

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libres et pour saponifier les acides gras combinés (les esters) présents dans les corps gras [144]

▪ Protocole expérimentale :

Dans un ballon de 250ml, on introduit 1g d'HE de Thym et 25ml d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.5M à l'aide d'une burette. L'ensemble est porté au reflux pendant 90min. Après refroidissement de la solution, on ajoute 5 gouttes de phénolphtaléine. L'excès de KOH est titré par une solution d'acide chlorhydrique (HCL) 0.5N. Le point d'équivalence a été mis en évidence de la même manière expliquée précédemment (Figure II.5).

Une opération à blanc est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment.

Pour calculer l'indice de saponification on utilise la formule suivant :

$$I_s = \frac{C_{HCl} \times M_{KOH} \times (V_0 - V_1)}{m} \quad \text{Formule II.8}$$

$$I_s = \frac{28.05 \times (V_0 - V_1)}{m}$$

Formule II.9

Avec

I_s : indice de saponification en mg

C_{HCL} : concentration de la solution d'acide chlorhydrique en mol/l

M_{KOH} : masse molaire du KOH en g/mol.

V_0 : Volume d'HCl versé à blanc en (ml).

V_1 : Volume d'HCl versé essai en (ml).

m : masse de la prise d'essai en (g).

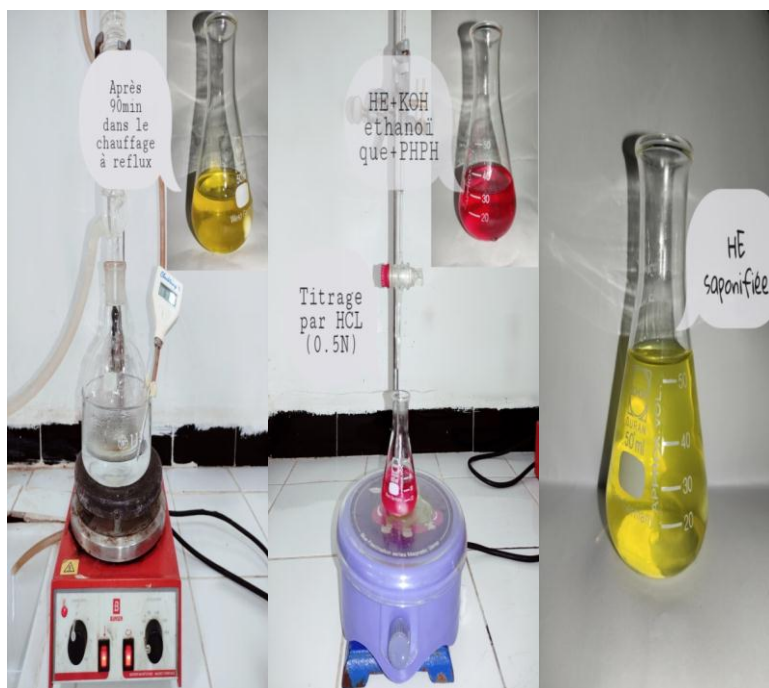


Figure II.5. Photo représentant la détermination de l'indice de saponification

II.3.2.3 Indice d'ester

L'indice d'ester est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile. L'indice d'ester est calculé par la formule suivante :

$$I_e = I_s - I_a$$

Formule II.10

II.3.3 Analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

La mesure des temps de rétention ne constitue pas une preuve formelle de la nature des composés. L'identification des composés est confirmée par la technique de couplage CG/SM. La technique consiste à injecter une solution d'huile essentielle dans une colonne, chaque soluté passe dans la source d'ionisation du spectromètre où les molécules sont bombardées par un faisceau électronique qui provoque leur ionisation positive. Les fragments chargés sont séparés selon leur masse et détectés en proportion de leur nombre. Ils fournissent des informations sur la nature et la structure de la molécule qui les a produits. Dans le spectre d'une substance pure, l'ion moléculaire, s'il est présent, sera le dernier du spectre, suivi toutefois des pics correspondants à la présence des isotopes, et donnera la masse moléculaire de la substance [145,146]

L'appareillage utilisé, ainsi que les conditions opératoires de la GC/MS sont les suivantes :

Injecteur

- Température 250°C
- Mode d'injection : Split. 1 : 80
- Volume injecté : 0,2 µl

Colonne

- Type : HP-5MS
- Dimensions : long 30 m * Dint 0.25 mm * épaisseur film 0.25 µm
- Phase stationnaire : 5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane. (Autre : Spécifier)
- Température du four: 60°C pendant 8min, 2°C/min jusqu'à 250°C., isotherme pendant 10 min..
- Durée d'analyse : 113 min
- Gaz vecteur : Hélium pureté avec un débit de 0.8 ml/min
- Débit GV : 0.5 ml/min

Détecteur de masse

- Mdde d'analyse : Scan TIC (de 30 à 550)
- Délai du solvant : 3.5min
- Température de l'interface : 280 °c
- Type d'ionisation : Impact électronique
- Intensité du filament : 70 év
- Type de l'analyseur de masse : Quadripôles
- Température de la source : 230 °c à 150 °c

Equipement

- Chromatographe : Hewlett Packard Agilent 6890 plus
- Spectromètre de masse : Hewlett Packard Agilent 5973



Figure II.6. Photo représentant le montage CPG/SM utilisé

Tableau II.5 : Composition chimique de l'huile essentielle de Thym

Composés principaux	Origine	Références
Thymol (58,1 - 44,4%) p-cymène (18,5 - 9,1%) γ -terpiène (18,0 - 6,9%) carvacrol (4,2 - 2,4%)	Algérie (Mostaganem)	[10]
Thymol (70 - 30%) p-cymène (20 - 15%) Carvacrol (15 - 3%) γ -terpinène (10 - 5%)	Algérie (M'sila)	[16]
γ -terpinène (25,70 %) thymol (20,83 %) p-cymène (20,04 %)	Algérie (Djelfa)	[147]
Carvacrol (48,4%) thymol (5,6 %)	Algérie (Chlef)	[148]
Carvacrol (83,66%) p-cymène (3,623%) thymol (2,85%)	Algérie (Chlef)	[14]
Carvacrol (83,8%) p-cymène (8,15%) γ -terpinène (4,96%)	Algérie (Bouira)	[149]
Thymol (42,01%)	Maroc	[150]

p-cymène (14,34%) γ-terpinène (12,06 %) carvacrol (5,07%)		
Thymol (46,2%) γ-terpinène (14,4%) p-cymène (9,9%) linalool (4%)	Turquie	[23]
Thymol (46,21 %) γ-terpinène (14,08%) p-cymène (9,91%) linalol (3,99%)	USA	[135]

II.3.4 Activité anti-reflux :

Le reflux gastro œsophagien (RGO) est un phénomène intermittent qui survient chez certain sujet. Il a été montré que l'apparition du RGO est influencée par des facteurs alimentaires, certaines hormones et certains médicaments, les graisses, le chocolat, la caféine et l'alcool [151] [152]

La propriété anti-reflux d'un médicament se traduit par sa capacité de formation d'un radeau sous forme d'un gel visqueux qui surnage au niveau du contenu gastrique et protège la muqueuse œsophagienne lors des épisodes de reflux.

En vue de déterminer la capacité de formation du radeau de notre huile essentielle, on introduit 7.5 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 0.1M dans un bécher à une température de

36.5 à 37.5 °C dans un bain-marie, en prenant la précaution d'ajuster le volume d'eau du bain au même niveau que celui de l'acide dans le bécher. Mettre 1 ml d'HE au centre du bécher, après 30 min, un radeau flottant est observé au niveau du bécher.



Figure .II.7: Photos de l'activité anti-reflux.

II.3.5 Activité antiacide :

L'activité antiacide est assurée par la neutralisation de l'acide gastrique. Pour cela, on a effectué une étude du profil de neutralisation du produit de référence

Le test du profil de neutralisation *in vitro* simule l'effet de l'huile essentielle au niveau de l'estomac en présence de la sécrétion gastrique. Elle s'effectue en insérant une goutte d'huile essentielle chaque 5 minutes dans un bécher contenant 20 ml d'acide chlorhydrique (HCl ; 0.1M), avec une agitation continue. Le contrôle du pH est effectué en fonction du temps



Figure .II.8 : Photos de l'activité antiacide.

II.4. Activités biologiques

II.4.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE est effectuée suivant la méthode de diffusion de disque (Aromatogramme). Cette méthode est simple et efficace pour tester la sensibilité ou la résistance des bactéries. L'activité antibactérienne sur la cible est appréciée par la mesure de la zone d'inhibition [82,153].

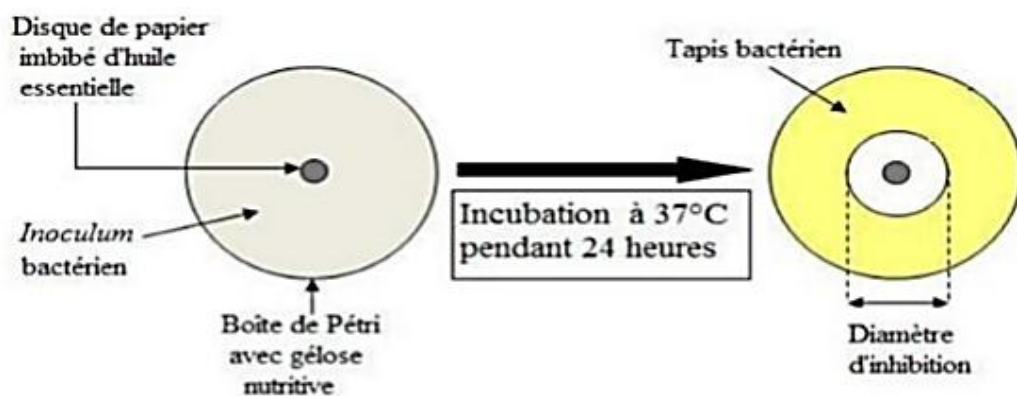


Figure II.9. Principe de la diffusion sur disque [154]



On a travaillé sur les souches de collection internationale ATCC (American type culture collection), ces souches ont toutes été fournies par le laboratoire microbiologique de Dr.zibouche de la wilaya d'Ain defla.

Souches bactériennes

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de laurier noble est évaluée sur trois souches bactériennes qui ont été entretenues par repiquage sur GN. Incubées pendant 24h à 37 °C, puis conservées à 5 °C. Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de laurier noble sont les suivantes :

- Staphylococcus aureus ATCC 25923
- Pseudomonas Aeruginosa ATCC 27853
- Escherichia coli ATCC 2592

Tableau II. 6. Descriptions des différents microorganismes utilisés dans cette étude.

Souches bactériennes	Morphologie et type de Gram	Habitat et origine	Pouvoir pathogène
<p>Escherichia coli</p> 	<p>Coccobacilles à Gram négatif</p>	<p>Commensal de l'intestin digestif de l'homme et des animaux</p>	<p>Diarrhées, gastro-entérites, infections urinaires</p>
<p>Pseudomonas Aeruginosa</p> 	<p>Bacilles à Gram négatif</p>	<p>Germe ubiquitaire, vivant en milieu humide et fréquent en milieu hospitalier</p>	<p>Infections pulmonaires, infections urinaires, méningites, septicémies</p>

<p>Staphylococcus aureus</p> 	<p>Cocci à Gram positif</p>	<p>Ubiquitaire dont le réservoir est localisée au sein de la peau et des muqueuses</p>	<p>Intoxications alimentaires, infections cutanées et des muqueuses, septicémies, pneumonies</p>
---	-----------------------------	--	--

Mode opératoire

Préparation des dilutions de l'huile essentielle

- ✓ Réaliser une série de dilution de l'HE dans le DMSO préparé en laboratoire en débutant par une dilution à 1/2 jusqu'à la dilution de 1/16 dans des tubes en verre stériles.
- ✓ Le 1^{er} tube contient **100µl** d'huile essentielle et **100 µl** de DMSO.
- ✓ **100 µl** de la première dilution sont transférées dans le deuxième tube auquel on rajoute **100µl** de DMSO pour obtenir une dilution 1/4.
- ✓ Les dilutions à 1/8, 1/16 sont préparés de la même manière.
- ✓ et on a aussi un tube de **200 µl** d'huile essentielle pure

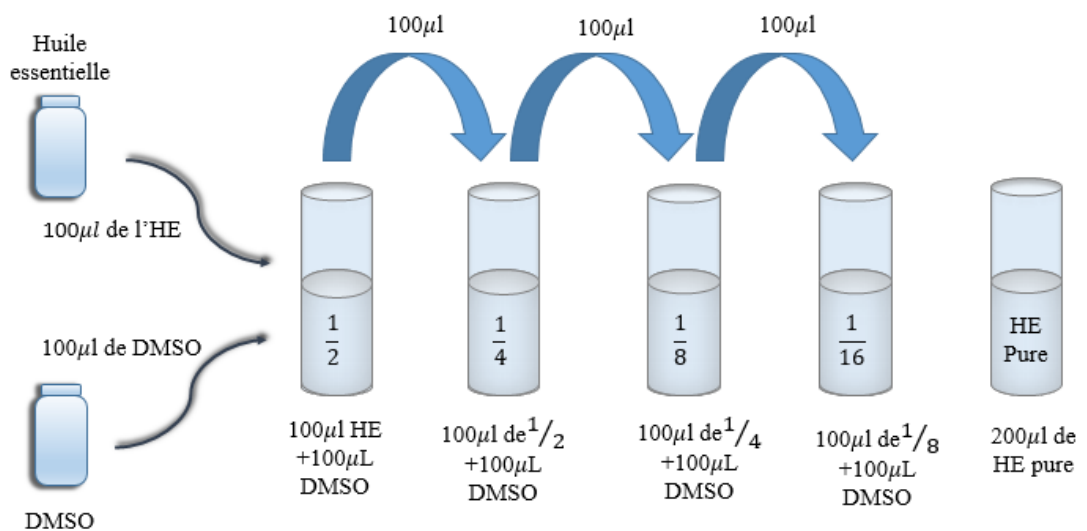


Figure II.10. Préparation des différentes dilutions

+ Préparation des suspensions microbiennes

- ✓ A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une pipette pasteur scellée, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- ✓ Décharger la pipette pasteur dans 2 ml d'eau physiologique stérile.
- ✓ bien homogénéiser la suspension bactérienne,
- ✓ l'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum

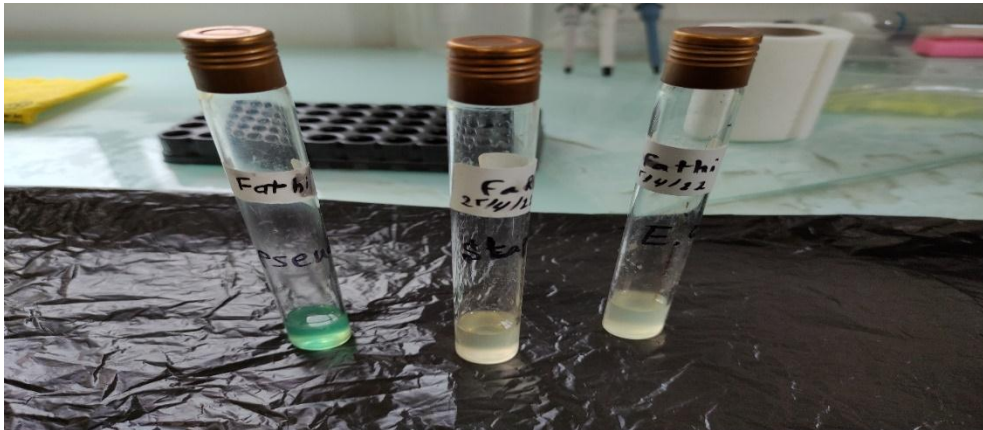


Figure II.11. Photo représentant les préparations des suspensions microbiennes

Protocole expérimental (aromatogramme des souches)

+ L'ensemencement

- ✓ Le milieu de culture utilisé est Muller– Hinton (MH), qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.
- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans le tube qui contient la suspension bactérienne (pour éviter la contamination du manipulateur et de la paillasse).
- ✓ Utilisez un écouvillon pour essuyer toute la surface de la gélose sèche en bandes serrées de haut en bas.
- ✓ Répétez cette opération plusieurs fois, à chaque fois faites pivoter la boîte de Pétri de 60°, et faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Passer l'écouvillon à la périphérie de la gélose pour terminer l'inoculation.

Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri, l'écouvillon doit être rechargé à chaque fois.



Figure II.12. Photo représentant L'étape de l'ensemencement sur la surface gélose d'une boîte

✚ Dépôt des disques d'aromatogramme

Une fois les géloses Muller – Hinton sont ensemencées. Des disques imbibés dans l'huile essentielle diluée sont disposés sur la surface du milieu MH à l'aide d'une pince stérile. (Commençant par la solution la moins concentrée jusqu'à la plus concentrée pour chaque souche étudiée). Les boîtes sont incubées pendant 24h à 37C (**figure II.10**).



Figure II.13. Le dépôt des disques sur une surface gélosée [100]



Figure II. 14. Photo représentant l'incubation des boîtes

La lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, y compris le diamètre des disques, ou des halos clairs tout autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des HEs.

L'inhibition est notée comme suit :

- Non sensible (-) pour les diamètres inférieur à 8 mm.
- Sensible (+) pour les diamètres de 8 à 14 mm.
- Très sensible (++) pour les diamètres de 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20 mm

II.4.2 Activité antioxydant

L'activité antioxydant in vitro a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH. Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle testée a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel (l'acide ascorbique).

Principe

Le DPPH, connu officiellement comme le 2,2-diphényl 1- picrylhydrazyl. Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique à 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (Figure III.9). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [155]

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation II.1 :



Où : (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine de couleur jaune [156]

✚ Détermination du pourcentage d'inhibition

D'après Khodashenas l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (P_I %) est calculée selon la formule II.10 suivante :

$$P_I = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100 \quad (\text{Formule II.10})$$

P_I : pourcentage d'inhibition (%).

A_{blanc} : Absorbance du blanc (DPPH dans l'éthanol),

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance du composé d'essai

Pour l'acide ascorbique (protocole positif)

On a utilisé l'acide ascorbique pour le test positif de l'effet antioxydant, on a suivi le même protocole que celui de l'HE, sauf qu'on a changé l'HE par l'acide ascorbique (vitamine C) et à la fin on a déterminé la valeur de IC_{50} de l'acide ascorbique

✚ Préparation de la solution DPPH

Une quantité de 0.0024mg de DPPH (1,1 Diphényl 2 PicrylHydrazil) est solubilisée dans 100ml d'éthanol absolue pour avoir une solution éthanoïque de DPPH. On laisse la solution reposer à une température ambiante pendant une heure



Figure II.15. Préparation d'une solution éthanoïque de DPPH

✚ Préparation des solutions d'HE

Dans un bécher sec stérile on introduit la solution mère qui contient $100 \mu\text{l}$ d'huile essentielle, on ajoute 1 ml d'éthanol.

✚ Essais au DPPH

Dans huit tubes secs et stériles, on prépare :

1. $2.5 \mu\text{l}$ de solution mère + 1 ml de DPPH
2. $5 \mu\text{l}$ de solution mère + 1 ml de DPPH
3. $25 \mu\text{l}$ de solution mère + 1 ml de DPPH
4. $40 \mu\text{l}$ de solution mère + 1 ml de DPPH
5. $60 \mu\text{l}$ de solution mère + 1 ml de DPPH
6. $80 \mu\text{l}$ de solution mère + 1 ml de DPPH
7. $100 \mu\text{l}$ de solution mère + 1 ml de DPPH
8. $200 \mu\text{l}$ de solution mère + 1 ml de DPPH
9. $300 \mu\text{l}$ de solution mère + 1 ml de DPPH



Figure II.16. Essais de DPPH avec les différents volumes de solution mère

La procédure se déroule comme suit :

- ✓ Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité
- ✓ L'absorbance est lue à 517 nm par un spectrophotomètre.

II.4.2.3 détermination de la concentration effective (EC₅₀)

La concentration effectrice (EC₅₀) est défini comme étant la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH* initiale de 50%, ou bien en d'autre termes, c'est la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet piègeur du radical DPPH (concentration équivalente à 50% de DPPH perdu). Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance anti radicalaire.

(Formule II.11) $A = \frac{1}{EC_{50}}$

A : Puissance anti radicalaire.

EC₅₀ : La concentration effectrice d'échantillon pour réduire 50% de DPPH.

✚ Préparation des dilutions de la vitamine c :

Dans un bécher sec et stérile, on introduire 100 ppm de l'acide ascorbique et 10 ml éthanol

✚ Essai au DPPH

Dans huit tubes stériles on prépare comme suit :

1. 2.5 µl d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
2. 5 µl d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
3. 25 µl d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
4. 40 µl d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
5. 60 µl d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
6. 80 µl d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
7. 100 µl d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
8. 200 µl d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
9. 300 µl d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH

Les solutions sont incubées pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance est lue à 517 nm par un spectrophotomètre.

II.4.3 Activité anti inflammatoire

II.4.3.1 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro par inhibition de la dénaturation thermique des protéines (ovalbumine)

Le principe de la technique de la dénaturation de l'ovalbumine est basé sur la capacité de ces extraits (dans notre cas l'HE de thym) à réduire la dénaturation thermique de l'Ovalbumine (protéine de référence choisi pour sa stabilité lors du processus anti-inflammatoire)

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon le protocole de **CHANDRA et al, (2012)** avec quelques modifications.

Mode opératoire

Les différentes étapes sont résumées comme suite :

- ✓ on prépare une solution d'ovalbumine à 2%. Pour cela, 2g d'ovalbumine est dissoute dans 100 ml d'eau distillé
- ✓ on prépare une solution standard en dissolvant 100 mg de diclofenac de sodium dans 10 ml d'eau distillé.
- ✓ on prépare une deuxième solution standard en dissolvant 500 mg d'aspirine dans 10 ml d'eau distillé.
- ✓ on prépare une solution mère de l'HE de thym en dissolvant 500µl d'HE dans 1 ml d'éthanol.
- ✓ Le contrôle négatif est préparé avec 1ml d'eau distillée + 1 ml d'ovalbumine

Dans des tubes contenant différents volume de l'HE (50, 100, 200, 300, 400, 500 µl), et dans des tubes contenant chacun 1ml de solutions standards, nous avons ajouté 1 ml de solution d'Ovalbumine 2%. Ces tubes sont ensuite incubés à 37 C° pendant 5 min. Puis à 72 °C pendant 5 min. À la fin de l'incubation et refroidissement des solutions, l'absorbance est mesurée à 660 nm dans un spectrophotomètre.

Dans ce test, le diclofenac sodique et l'aspirine ont été utilisés comme anti-inflammatoire de référence.

✚ Détermination du pourcentage d'inhibition

Des pourcentages d'inhibition de la dénaturation ont été calculés selon la (**formule II.12**) suivante (**BOUHLALI et al ;2016**) :

$$\%I = (\text{Abs C} - \text{Abs T} / \text{Abs C}) * 100 \quad (\text{Formule II.12})$$

Avec :

Abs_{control} : Absorbance des échantillons contenant le diclofenac et l'aspirine

Abs_{test} : Absorbance des échantillons contenant l'HE de thym.

II.4.3.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro par inhibition de la dénaturation thermique des protéines (Albumine sérique bovine BSA)

Nous avons appliqué le test d'inhibition de la dénaturation du BSA provoquée par la chaleur (72°C) selon (Karthik et al. 2013) avec de légères modifications.

Mode opératoire

0.05 ml de chaque concentration d'extrait (HE) et de standards a été ajouté à 0.45 ml de solution de BSA 5 % préparé dans le Tris HCL (1N) à pH : 6,3. Les mélanges sont ensuite incubés à 37 C° pendant 20 min. Puis dans un bain marie à 57 °C pendant 3 min. À la fin de l'incubation, les mélanges sont refroidis rapidement, puis leurs absorbances sont mesurée à 660 nm ou 416 nm dans un spectrophotomètre à cuve.

Dans ce test, le diclofénac sodique (10mg/ml) et l'aspirine (50mg/ml) ont été utilisées comme anti-inflammatoire de référence. La solution control test est composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillé.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation est calculé par la formule suivante :

(Formule II.13)

$$\%I = (\text{Abs}_{\text{extrait}} - \text{Abs}_{\text{Control}} / \text{Abs}_{\text{Control}}) * 100$$



Chapitre III

Résultats et discussion



Cette partie est consacrée à la discussion des résultats de l'extraction de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis*, de sa caractérisation organoleptique, sa cinétique de rendement ainsi que son activité antibactérienne et antioxydante et anti inflammatoire .

III.1. Détermination du Taux d'humidité :

Pour calculer le taux d'humidité de thym, nous avons pesé la plante fraîche, en suivant son poids jusqu'à sa stabilité comme il est représenté dans **Figure III.1**

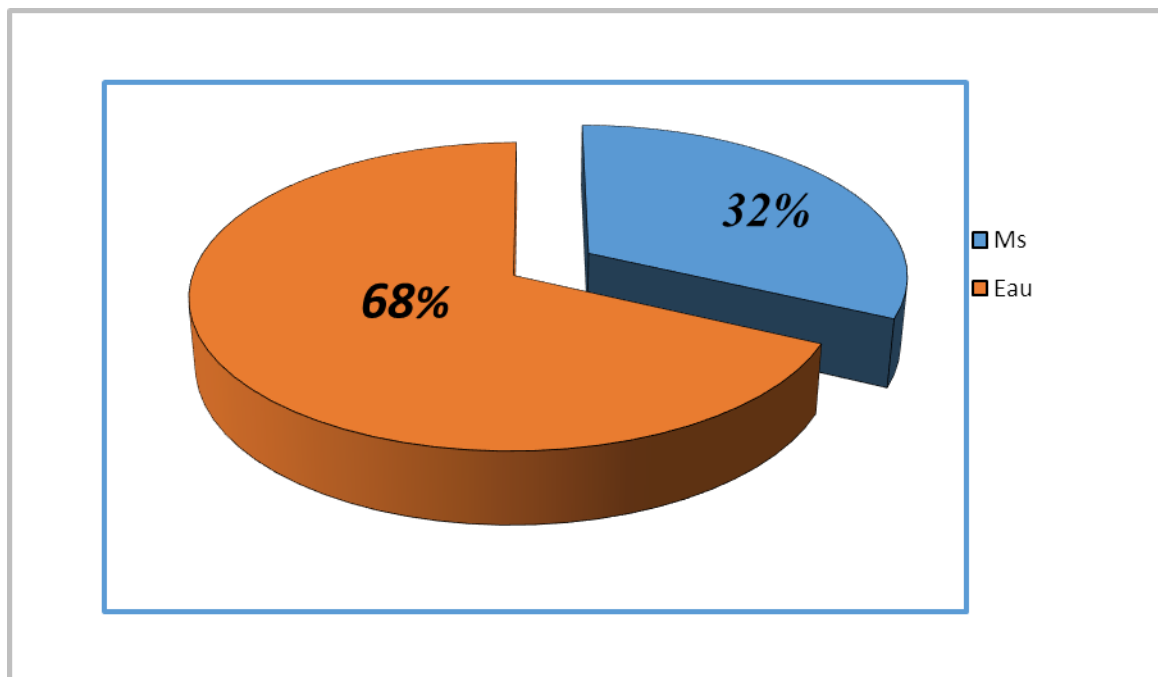


Figure III.1 : Teneur en humidité de thym

❖ Discussion :

Les valeurs du **la Figure III.1** Les résultats de l'étude montrent que le Thym est riche en eau. En effet, la partie aérienne de cette espèce renferme un taux d'humidité important de 68% et la matière sèche ne représente que 32% ; cela signifie que plus de la moitié de la partie fraîche est constituée par l'eau, ceci influe négativement sur leur bonne conservation, sur la durée d'extraction et donc sur le rendement.

III.2. Cinétique et rendement d'extraction de l'huile essentielle :

La cinétique d'extraction comprenait la détermination du rendement en fonction du temps d'extraction. Le but de cette étude était de déterminer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et d'éviter les pertes de temps et d'énergie.

III.2.1. Etude cinétique de l'extraction de l'HE de Thym à partir de feuilles sèches :

Nous surveillons l'extraction des huiles essentielles à partir de la masse de 80g de feuilles de Thym séchées. Les résultats obtenus sont présentés dans **la figure III.2.**

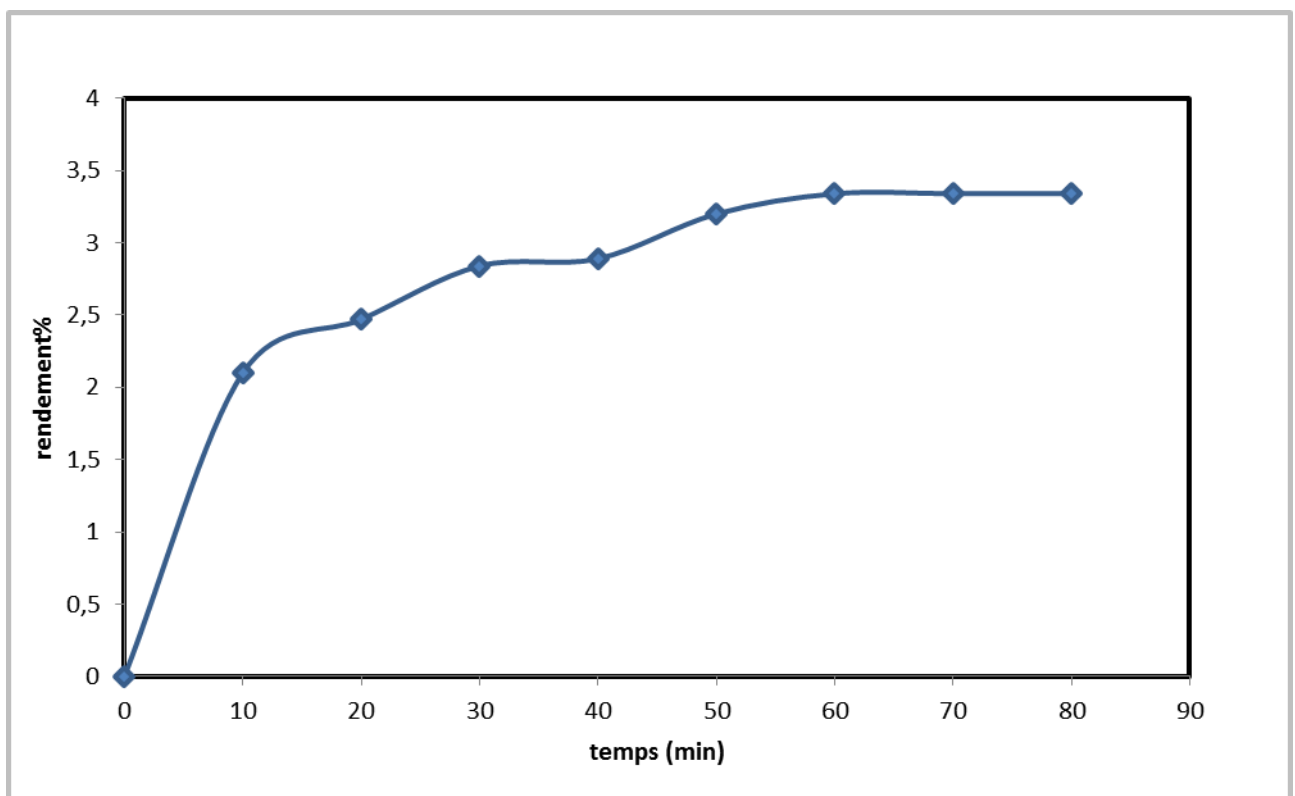


Figure III. 2. Evolution du rendement d'extraction de l'HE de Thym Sec en fonction du temps

Les résultats du suivi de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle des feuilles sèches de thym, indique que le rendement augmente de façon proportionnelle pour une durée d'extraction de 60 min atteignant son paroxysme pour une valeur de 3.34 % , Au-delà de cette durée, le rendement se stabilise, il correspond donc au temps nécessaire pour extraire la quasi-totalité de çl'huile contenue dans la plante

III.2.2. Etude cinétique de l'extraction de l'HE de Thym fraîche :

Le rendement en huile essentielle est exprimé en masse d'huile essentielle obtenue pour 40 g de matière végétale fraîche. Les résultats obtenus sont regroupés dans **la figure III.3**

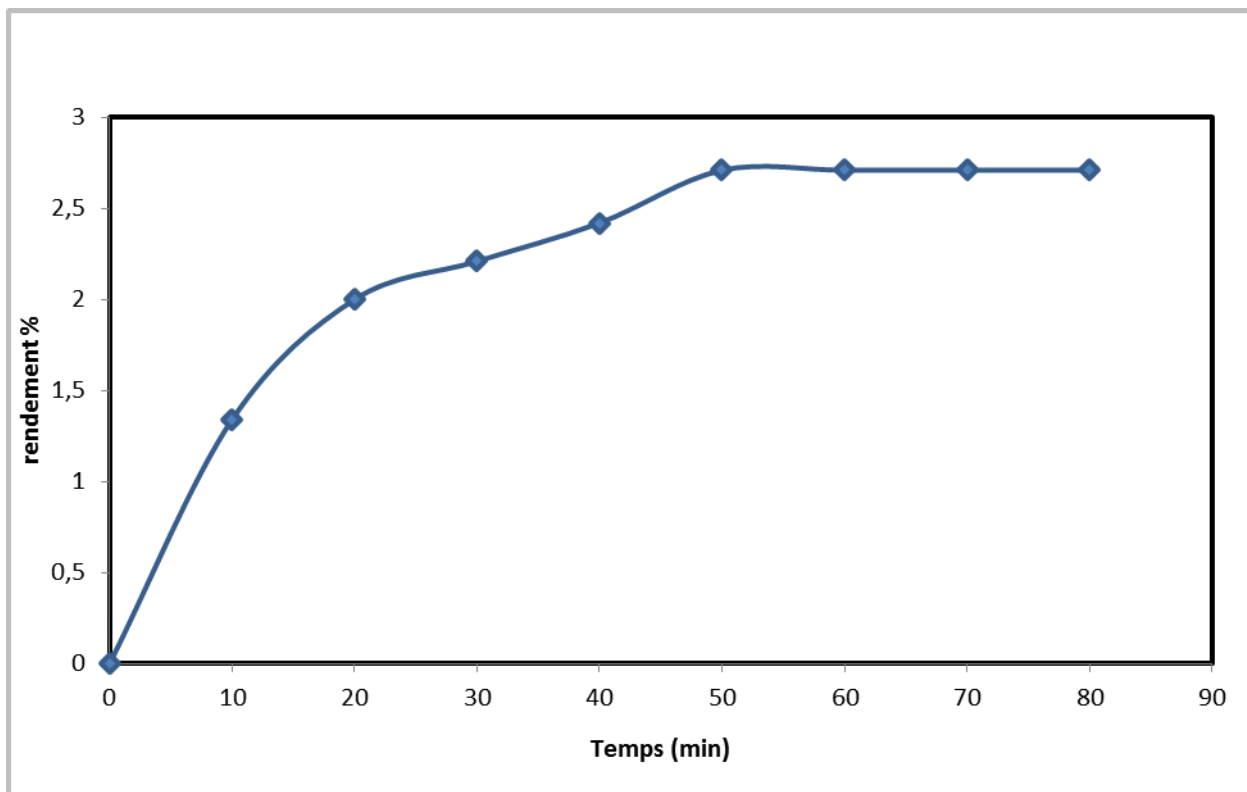


Figure III. 3 : Evolution du rendement d'extraction de l'HE de Thym frais en Fonction du temps

La figure III.3 montre que le rendement d'HE varie proportionnellement en fonction de la durée d'extraction jusqu'à sa stabilité à 2,71(%) au bout de 60 min ou la matière végétale est alors totalement épuisée. La durée optimale d'extraction a été déterminée par 60 min.

On remarque que l'extraction à partir du thym sec est plus rapide et offre un rendement (3,38%) plus important que l'extraction à partir du thym frais (2,71%) ; c'est pour cela que nous avons choisi d'utiliser le thym sec pour le reste de notre travail.

III.2.3. Rendement en huile essentielle :

L'extraction de l'HE de *Thymus algeriensis* de la région de Ain Defla a révélé une valeur du rendement de l'ordre de 3.34%.

La différence enregistrée dans le rendement de l'HE de *Thym* est influencée par :


- les facteurs intrinsèques (Cycle végétatif, organe producteur, organe botanique, chémotype...)
- les facteurs extrinsèques (Conditions climatiques et environnementales, température, durée d'ensoleillement, fréquence et l'intensité de la précipitation, effet du stade de développement et période de récolte de la plante) [12].

III.3. Analyse physique :

III.3.1. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Thym :

L'hydrodistillation des feuilles de Thym séchés nous a permis d'extraction des huiles essentielles dont les caractéristiques organoleptiques observées figurent dans le **tableau.III.1**

tableau.III.1 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Thym.

Caractéristiques organoleptiques	Aspect	Couleur	Odeur
	Liquide mobile.	Jaune foncée.	Odeur très forte et épicée , caractéristique de Thym.
Norme AFNOR, 2000	Liquide mobile	Couleur traditionnellement allant du brun au brun-rouge	Odeur caractéristique aromatique, phénolique (thym) avec un fond légèrement épicé

❖ **Discussion :**

D'après les résultats du Tableau III.1, l'HE de thym est un liquide mobile qui possède une couleur jaune foncée et une odeur très forte et caractéristique. Ces résultats sont conformes à ceux cités dans la norme **AFNOR, 2000**. ont rapporté des résultats similaires pour l'huile essentielle de Thym.

III.3.2. Les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de Thym :

Les paramètres essentiels liés à la qualité de l'HE sont évidemment les propriétés physico-chimiques. Nous avons effectué ces analyses pour confirmer la qualité de l'HE de Thym en déterminant le pH, la densité, l'indice de réfraction, l'indice d'acide, l'indice d'aster, et l'indice de saponification.

Les valeurs des indices physico-chimiques de l'huile essentielle de la Thym comparés à ceux de **l'AFNOR (1989)**, indiquent que notre huile essentielle est de bonne qualité et conforme aux normes.

✚ **Densité relative :**

La densité relative de l'HE du Thym à 20°C, calculée par la méthode décrite précédemment (**Formule II.3, chapitre II**), est donnée dans le **tableau III.2**.

Tableau III.2 : la densité de l'HE étudiée

Donnés			densité de l'HE étudiée
m0 = 0.779 g	m1 = 2.215 g	m2 = 2.116 g	d = 0.931

❖

❖ **Discussion :**

La densité de notre HE est de 0.931, elle est inférieure à celle de l'eau, donc elle est conforme aux normes AFNOR. Notre résultat est proche de ceux trouvé par d'autres auteurs : 0,912 et 0,935 pour la même huile essentielle [14], [157]

✚ Indice de réfraction ;

Le réfractomètre utilisé est de type ABBE, il est muni d'un système de température, d'une Lampe de sodium, et d'un thermostat. On a fait une lecture directe sur l'appareil étalonné avec l'eau.

Après calcul, nous obtenons $I_R = 1.4708$ à 20°C . Ce résultat est conforme au norme **AFNOR (1989)**.

Tableau III.3 : Indice de réfraction de l'HE étudiée

Donnés			I _R de l'HE étudiée
n _{T'} = 1.466	T = 20 °C	T' = 32 °C	n _T = 1.4708

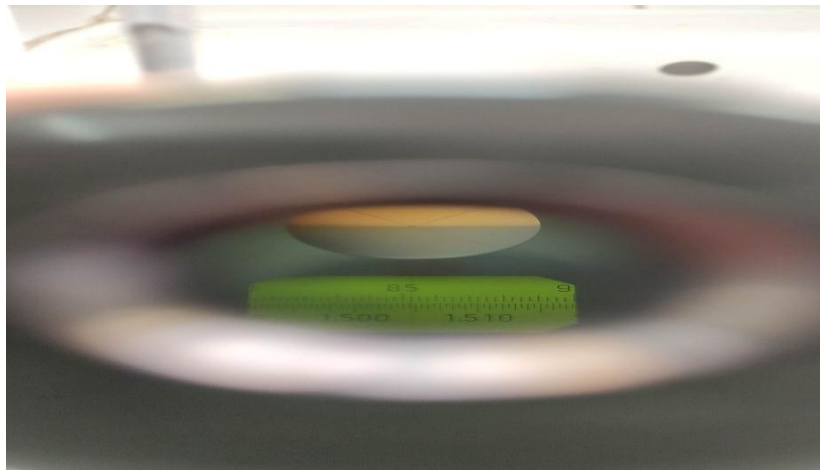


Figure III. 4. Photo représentant la lecture du résultat au réfractomètre

❖ Discussion :

L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement supérieur à celui de l'eau qui est égal à **1,333** à 20°C . Le faible indice de réfraction pour l'HE indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques [158].

En comparant nos résultats avec ceux obtenus dans les travaux antérieurs (**tableau II.4**) nous constatons que:

La valeur de l'indice de réfraction de notre huile essentielle (1.4708) est très proche de ceux donnés par [16, 150, 152] et est supérieur à ceux obtenus par [14,141]

Cette variation de l'indice de réfraction est due à la variation de la composition chimique de l'HE, plus exactement la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé [159]

✚ Détermination du potentiel hydrogène (pH)

le pH est un paramètre qui mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H^+), donc permet de définir si un milieu est acide ou basique. La valeur du pH de l'huile essentielle de la Thym est $pH=5$, donc notre HE est acide et de ce fait est conforme aux normes internationales des huiles essentielles.

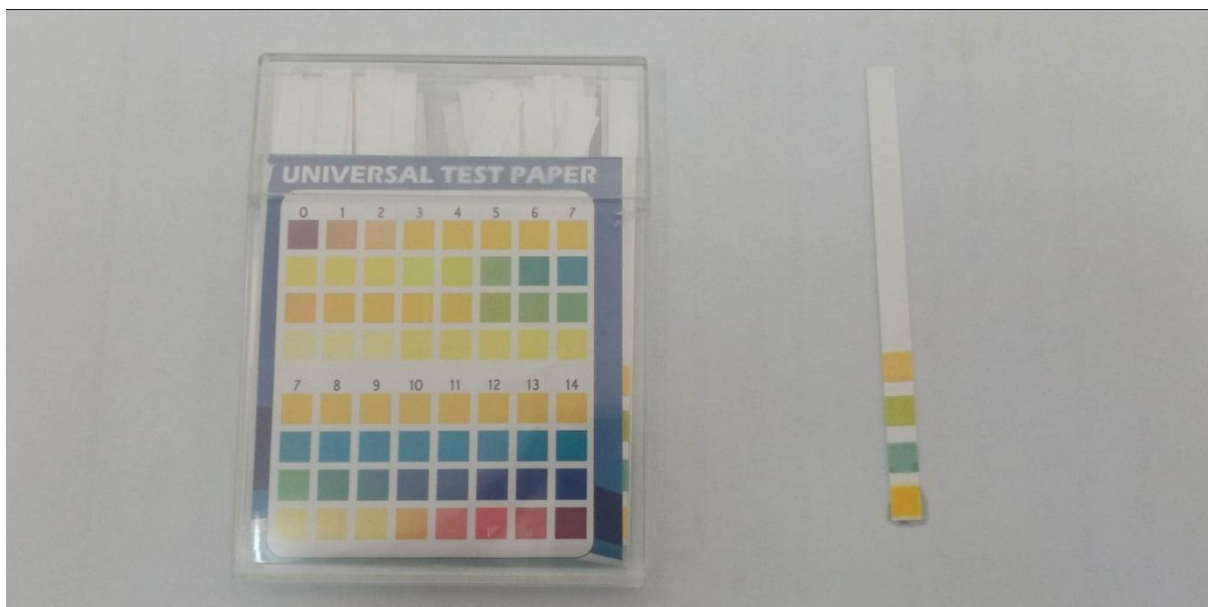


Figure III. 5. Photo représentant le pH de l'HE de Thym

✚ L'indice d'acide :

L'indice d'acide (I_A) de l'HE extraite est calculé en utilisant la formule décrite dans le chapitre II. Elle est présentée dans le **tableau III.4**.

Tableau III.4 : Indice d'acide de l'huile essentielle

Donnés		I_A de l'HE étudiée
$m= 0.5 \text{ g}$	$V_{KOH}= 0.4 \text{ ml}$	$I_A= 4.48$

❖ Discussion :

L'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides gras libre dans l'huile, ce qui peut nous aider à connaître la qualité de nos produits ; En effet, plus l'IA est bas, meilleure est l'huile essentielle. L'IA de notre HE extraite du thym est de 4.48, il est proche à celui promulgué par la norme **AFNOR (2000)** qui est de l'ordre de 4.5 à 6.5. Ce qui signifie que notre HE est fraîche et de bonne qualité.

Contrairement à notre HE, l'HE de thym de Tlemcen en Algérie présente un indice d'acide élevées par rapport aux normes : 8,4, ainsi que l'espèce du Maroc qui présente un IA = 6,4 (**Tableau II.4**). Ce taux élevé en IA est due aux conditions d'extraction, de conservation et de stockage. En effet, c'est pendant la période de stockage que l'huile peut subir des dégradation telle l'hydrolyse des esters [160].

✚ L'indice de saponification :

L'indice de saponification (I_s) de l'HE est déterminé selon la méthode décrite dans le chapitre II (**Formule II.9**) et présenté dans **le tableau III.5**.

Tableau III.5 : Indice de saponification de l'huile essentielle

Donnés			I_s de l'HE étudiée
$V_0 = 19.4\text{ml}$	$V = 18\text{ ml}$	$m = 1\text{ g}$	$I_s=39.27$



Figure III.6 : neutralisation

L'indice de saponification indique simplement combien de milligrammes de base sont nécessaires pour saponifier complètement 1 gramme de matière grasse (huile ou graisse). Ce nombre indique généralement la quantité d'hydroxyde de potassium (potassium) nécessaire plutôt que la quantité d'hydroxyde de sodium (NaOH) nécessaire. . Dans notre cas, il faut 39.27 g de soude pour saponifier 1g d'huile essentielle de thym

Indice d'ester :

L'indice d'ester (I_E) de l'HE extraite est calculé en utilisant la formule décrite au chapitre II (**Formule II.10**).

Tableau III.6 : Indice d'ester de l'huile essentielle

Donnée		I_E de l'HE étudiée
$I_s = 39.27$	$I_A = 4.48$	$I_E = 34.79$

Les esters sont des molécules quasiment non toxiques aux doses physiologiques normales. Nous obtenons dans nos résultats un rapport d'indice d'ester de 34.79

III.4. Analyse chimique :

III.4.1. Analyse de la Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CPG/SM) :

Afin de bien caractériser notre HE et déterminer sa composition chimique, nous avons analysé celle-ci par la chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC/MS). Cette analyse a été effectuée au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) .

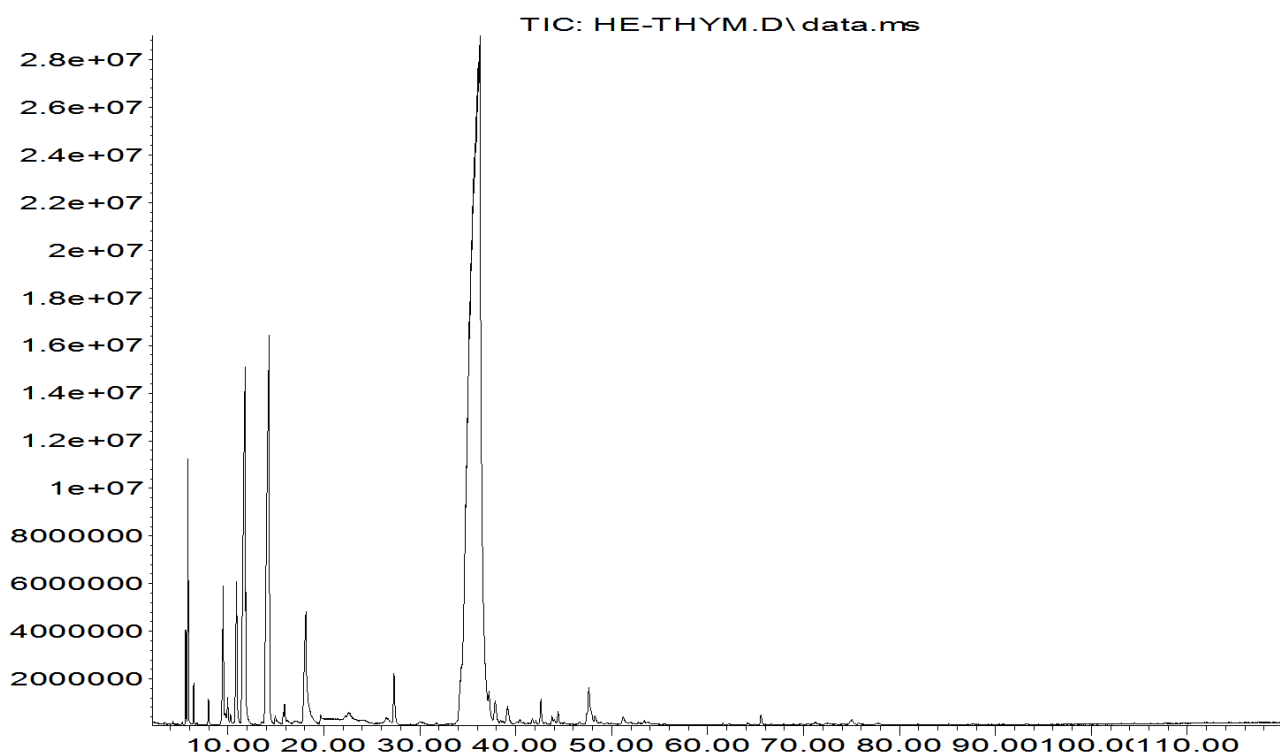
Les résultats de l'analyse de notre HE par la GC/MS sont présentés dans **le Tableau.III.7**

Tableau.III.7 : composition chimique de l'huile essentielle de Thym

N°	Composé identifiant	Temps de rétention (min)	Pourcentage (%)
1	α -thujène	5.592	0.55
2	α-pinène	5.539	1.66
3	Camphène	6.422	0.23
4	β-pinène	9.506	1.57
5	l-Phellandrene	9.965	0.30
6	α-Terpinène	10.895	1.79
7	Benzène	11.77	7.71
8	γ-Terpinène	14.286	9.22
9	cis-sabinène hydrate	14.933	0.14
10	Bicyclo	15.91	0.16
11	Linalool L	18.106	2.88
12	Camphor	19.660	0.13
13	Cis-dihydrocarvone	26.505	0.25
14	Carvacrol méthyl ether	27.306	0.68
15	Tymol	36.259	68.67
16	Carvacrol	37.206	0.64
17	trans-Caryophyllène	37.848	0.49
18	β -Panasinsène	39.131	0.39

19	Ledene	42.610	0.29
20	Naphthalene	44.411	0.14
21	1H-Cycloprope	47.619	0.89
22	Azulene	48.261	0.11
23	Cyclohexene	51.204	0.16

Abundance



Time-->

Figure.III.7 : chromatographie en phase gazeuse couplée avec spectromètre

❖ **Discussion :**

L'analyse de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (**tableau III.7**) a permis d'identifier au total 23 composés qui représente plus de 99 % des constituant de notre HE. Le thymol apparaît comme le constituant principal de l'huile essentielle (68.67%), suivi du γ -Terpinen (9.22 %), du benzene (7.71 %) et du Linalool L (2.88 %).

D'après le **tableau II.5**, on remarque qu'en Algérie l'espèce *Thymus* est représentée par quatre chémotypes différents à savoir : **Thymol** dans les régions de Mostaganem et M'sila avec des teneurs variant entre (30 % - 70 %), **carvacrol** dans les wilayas : Ain Defla, Chlef et Bouira avec des teneurs de (48,4 % - 83,8 %), **γ -terpinène** (25,7%) dans la région de Djelfa et **Linalool** (82,88%) dans la région de Blida. De ce fait, nous pouvons conclure que le composé majoritaire de notre HE qui est le phenol (68,67%) correspond au thymol et carvacrol. En effet, la présence des quantités élevées de thymol et de carvacrol dans l'huile essentielle est responsable de l'odeur agréable ce qui caractérise ce genre de Thym [10].

III.4.2. Activité antiacide :

Les résultats de contrôle du pH effectués en fonction du temps sont présentés dans la **Figure III.8**

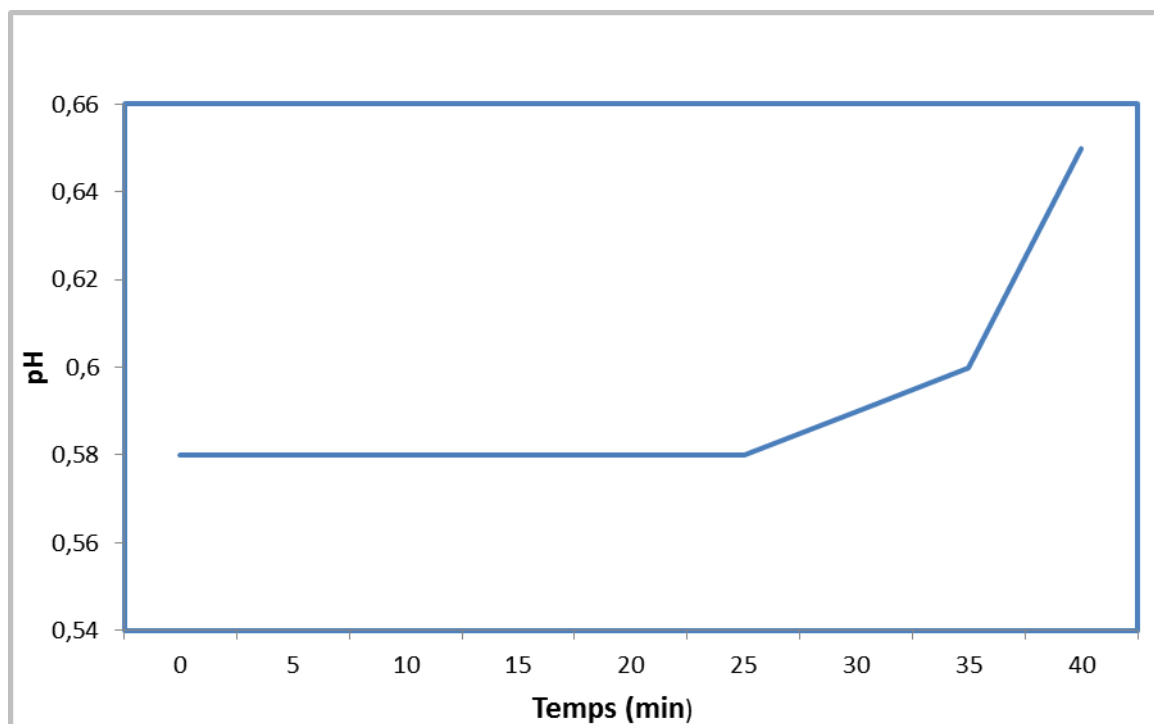


Figure III.8 : Evolution du PH en fonction du temps

la figure III.7 montrent que le pH de la solution d'HCl diminue lorsqu'on ajoute des gouttes de l'HE de thym jusqu'à se stabiliser après un temps de 15 min d'agitation. De ce fait, nous concluons que l'HE de thym a une activité antiacide, donc peut être utilisée pour neutraliser l'acidité gastrique.

III.4.3. Activité anti reflux :

Une étude de l'activité anti-reflux par Thym a montré que 30 minutes après l'introduction d'HE dans le contenu acide du bécher, aucun changement ne s'est produit. De ce fait, nous pouvons conclure que l'huile essentielle de Thym n'a pas d'effet anti-reflux

III.5. Analyse biologique :

L'huile essentielle de Thym a été testée pour son activité antioxydant, antibactérienne et anti-inflammatoire.

III.5.1. Activité antioxydant :

Le test antioxydant sur l'HE de Thym est évalué par la méthode du piégeage du radical libre DPPH et en le comparant avec l'acide ascorbique.

Calcul du pourcentage d'inhibition :

Le pourcentage d'inhibition de l'HE de Thym et de la vitamine C de l'absorbance du DPPH sont représentés dans le (Figure III.9)

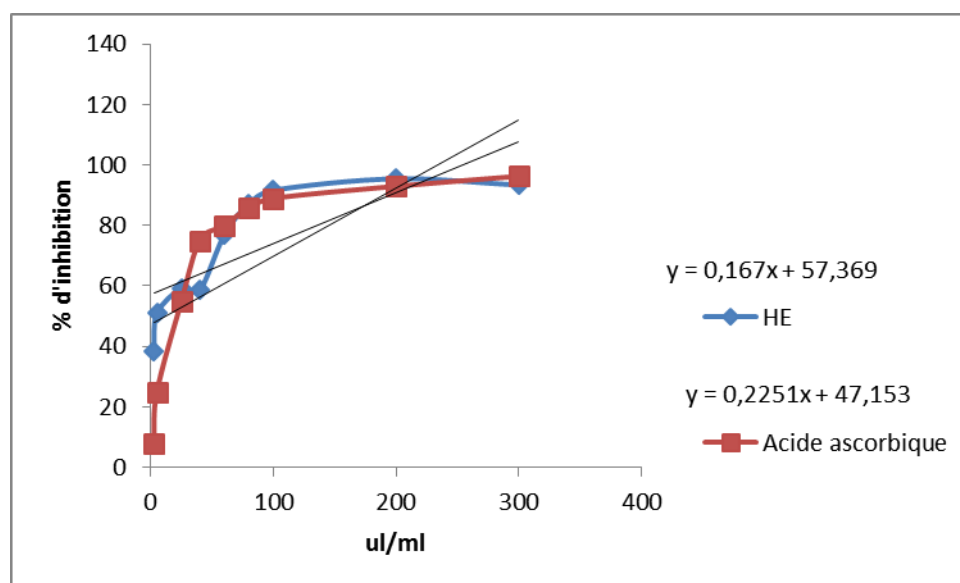


Figure III.9. Pourcentage d'inhibition de l'HE et acide ascorbique de Thym par la méthode du DPPH.

La figure. III.9 montre que le pourcentage d'inhibition du radical de DPPH augmente en fonction de la concentration de l'HE et de l'acide ascorbique. Cependant, le pourcentage

d'inhibition varie selon le produit examiné. En effet, l'HE de Thym présente un pourcentage d'inhibition du radicale DPPH inférieur à celui de la vitamine C, et cela pour toutes les concentrations étudiées. Pour une concentration de 300 µg/ml, un fort pourcentage d'inhibition est obtenu avec la vitamine C (84.70%) et un pourcentage de (93.36%) pour l'HE. Notre HE présente alors une bonne activité antioxydant. Cette activité antioxydante est principalement due aux phénols qui forment les principaux composés de l'huile essentielle de thym extraite.

D'autres études ont démontrés l'effet antioxydant du thym .Selon l'étude de[161] et [162] l'EH de Thym a une grand activité anti oxydante en raison, en partie, de la présence de plusieurs composés, tels que le thymol, le thymol-méthyl-éther, le linalool et le carvacrol, dans leur compositions chimiques.

[163]et [164]du Maroc et selon une étude comparative ont trouvé que l'he du Thym a une forte activité qui dépasse celle de l'acide ascorbique.

III.5.1.1.Détermination IC50 :

L'IC50 a été déterminée graphiquement à partir de la figure représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'HE et de la vitamine C.

Les valeurs d'IC50 de l'huile essentielle de Thym et de la vitamine C sont représentées par le **Figure .III.10**

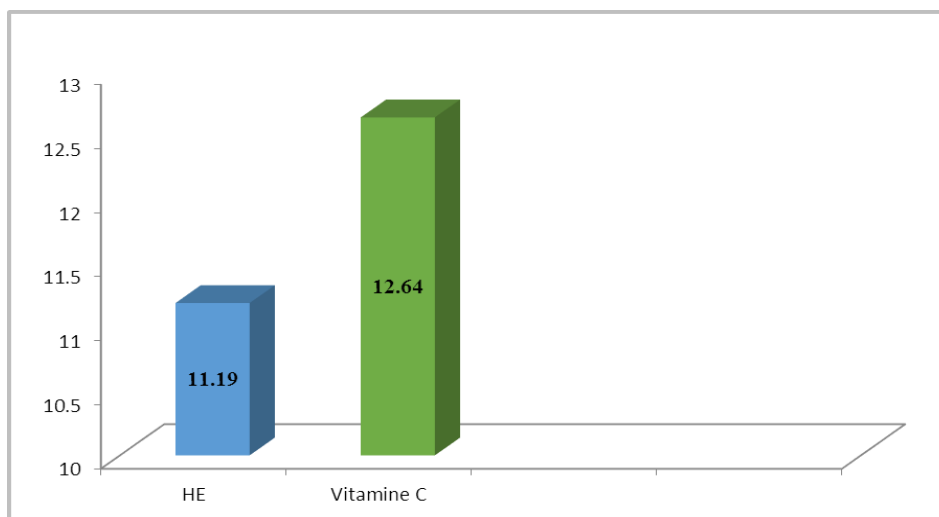


Figure .III.10: Représentation schématique de l'IC50 de l'HE et la vitamine C.

Les résultats montrent que la vitamine C présente un IC50 (12.64 ul/ml) supérieur à celui de l'HE de thym qui présente un IC50 plus faible (11.19ul/ml). Il semble que l'HE de Thym à une activité antioxydante importante puisque plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

III.5.2. Activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne de l'HE est testée par la méthode de diffusion sur disques (aromatogramme). L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo autour des disques. Cette forme de cercle clair autour des disques représente la zone d'inhibition. Elle est mesurée en millimètres, incluant le diamètre du disque en papier.

La sensibilité des souches bactériennes est traduite par le diamètre de la zone d'inhibition (DZI).

Une échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle en se basant sur les diamètres des zones d'inhibition permet de distinguer 5 classes d'HE :

- Très fortement inhibitrice : $D \geq 30$ mm
- Fortement inhibitrice : $21 \text{ mm} \leq D \leq 29$ mm
- Modérément inhibitrice : $16 \text{ mm} \leq D \leq 20$ mm
- Légèrement inhibitrice : $11 \text{ mm} \leq D \leq 16$ mm
- Non inhibitrice : $D \leq 10$ mm

Nous avons testé l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym à différentes concentrations par la méthode de l'aromatogramme, contre trois souches bactériennes, à savoir : *Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Les diamètres des zones d'inhibition observées autour des boîtes imprégnées d'huile essentielle de thym pure et ses dilutions après 24h d'incubation à 37°C, la sensibilité des souches bactériennes ainsi que le pouvoir d'inhibition de l'HE sont présentés sur le **tableau III.8, tableau III.9 et la figure III.11.**

Tableau.III.8: Estimation de l'activité antimicrobienne de notre HE pure sur les bactéries testées

Souche bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Classement	
		sensibilité	Inhibition de l'HE
Escherichia coli	35	Extrêmement sensible (+++)	Fortement inhibitrice
Staphylococcus aureu	37	Extrêmement sensible (+++)	Fortement inhibitrice
Pseudomonas Aeruginosa	9	Non sensible (+)	Non inhibitrice

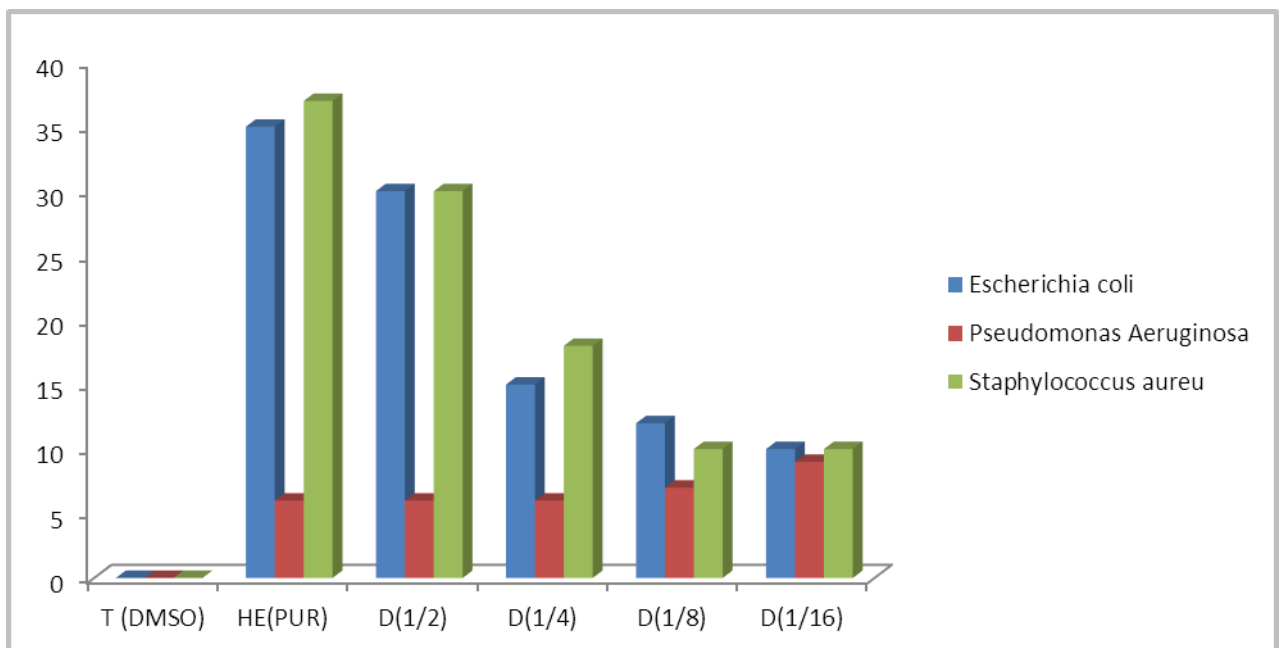


Figure III.11 : Diagramme de diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'activité antibactérienne de l'H.E de Thym en fonction de ses concentrations

Tableau III.9 : Diamètres des zones d'inhibition à différentes concentrations de l'HE testée et sensibilité des souches :

souche bactériennes dilutions	1/2	1/4	1/8	1/16
<i>Escherichia coli</i>	30 mm (+++)	15 mm (++)	12 mm (+)	10 mm (+)
<i>Staphylococcus aureu</i>	30 mm (+++)	18 mm (++)	10 mm (+)	10 mm (+)
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	7 mm (-)	6 mm (-)	6 mm (-)	6 mm (-)

❖ Discussion :

D'après les résultats de l'activité antibactérienne présentés dans le **tableau III.8** et la **figure III.11**, nous constatons que l'huile essentielle de thym pure a un effet positif sur les trois souches bactériennes étudiées, avec des zones d'inhibition de 35mm, 37mm et 9mm, respectivement pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureu* et *Pseudomonas Aeruginosa*. En effet, les souches d'*E.coli* et de *Staphylococcus aureus* sont extrêmement sensibles à l'HE et de ce fait sont fortement inhibitrices de ces souches bactériennes. Par contre, *Pseudomonas Aeruginosa* présente une zone d'inhibition de 9 mm, donc cette bactérie n'est pas très sensible à l'HE de thym et c'est ce qui nous permet de dire que notre HE n'est pas inhibitrice de cette bactérie.

Le **tableau III.9** montre que les bactéries *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureu* sont extrêmement sensible à l'HE de thym de concentration 1/2 µl/µl, puis cette sensibilité diminue avec la diminution de la concentration de l'huile essentielle.

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par [165]. Ils ont démontrés que l'huile de cette espèce était active sur trois souches bactériennes (*Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) avec des diamètres d'inhibition variant entre 24mm et 34mm pour l'extrait brut et 13 mm à 32 mm pour huile essentielle. *Staphylococcus aureus* était la souche la plus sensible en effet la concentration minimale inhibitrice de l'extrait brut de *Thymus vulgaris* vis à vis de *Escherichia Coli* est de 1/16.

Le fort pouvoir antibactérien de notre HE de thym est due à la forte teneur de cette HE en phenols (68.67%) (thymol et carvacrol). En outre, plusieurs huiles essentielles de thym d'autres régions et pays, riches en carvacrol ont déjà démontré un grand pouvoir antimicrobien in vitro [136, 142]. Aussi une action synergique entre le carvacrol et d'autre composés, tels que le p-cymène, a été déjà suggérée. ont rapporté que le p-cymène est un composé à un faible effet antimicrobien mais il a l'avantage de gonfler les membranes cellulaires des bactéries que le carvacrol [136].

III.5.3. Activité anti-inflammatoire :

L'activité anti-inflammatoire l'HE de *Thymus algeriensis* in vitro a été évaluée par deux méthodes de dénaturation des protéines (l'albumine sérique bovine et l'albumine d'œuf).

a) Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro par inhibition de la dénaturation thermique des protéines (ovalbumine) :

Les résultats de cette étude sont regroupés dans le **tableau III.10** et représentés par la **figure III.12**.

Tableau.III.10 : Pourcentage d'inhibition d'HE de Thym par le model d'Ovalbumine

C (µg/ml)	Pourcentage d'inhibition (%)		
	HE de Thym	Aspirine + ovalbumine	Diclofénac+ ovalbumine
50	13.37	19.83	38.48
100	31.73	31.46	46.25
200	36.52	34.86	54.10

300	38.12	55.31	68.51
400	49.1	56.31	63.52
500	65.06	67.73	65.32

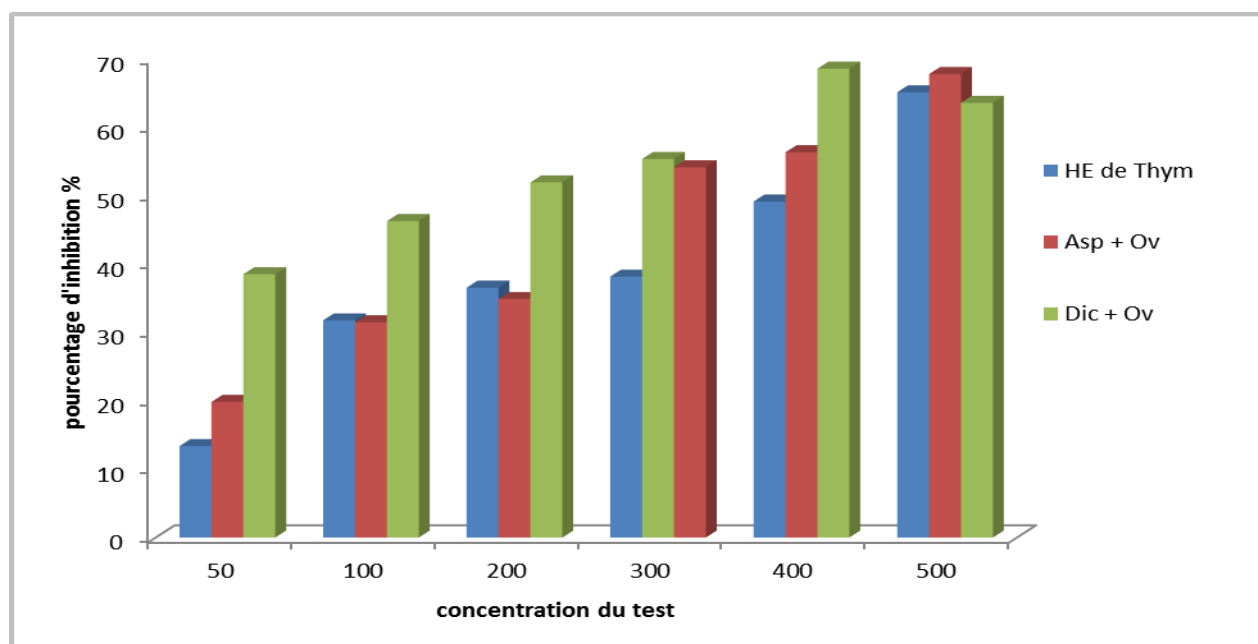


Figure. III.12 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique par l'HE de Thym

❖ Discussion :

La figure III.12 montre que plus la concentration des tests (diclofenac, l'aspirine et l'HE de Thym) augmente, plus l'effet inhibiteur augmente. Ainsi, les pourcentages de protection augmentent de 13,37 % à 65,06 % pour l'HE, 19,83% à 67,73% pour l'aspirine et de 38,48% à 65,32% pour le diclofenac. On observe que le pourcentage d'inhibition de l'HE à la concentration de 500 µg/ml est proche de celui du diclofenac à la même concentration. De cela, nous pouvons conclure que l'huile essentielle de Thymus algeriensis a un bon pouvoir d'inhibition de la dénaturation des protéines, donc un bon inhibiteur de l'Inflammatoire.

b) Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par inhibition de la dénaturation thermique des protéines (Albumine sérique bovine BSA) :

Nous avons appliqué le test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) provoquée par la chaleur (72°C) par l'huile essentielle, selon la méthode décrit par (KARTHIK *et al*, 2013). Les résultats sont représentés par la figure III.13 et le tableau III.11.

Tableau.III.11 : Pourcentage d'inhibition d'HE de Thym par le model de BSA

C (µg/ml)	Pourcentage d'inhibition (%)		
	HE de Thym	Aspirine + BSA	Diclofénac+ BSA
50	22.9	74.32	82.88
200	45	74.32	82.88
500	65.36	74.32	82.88

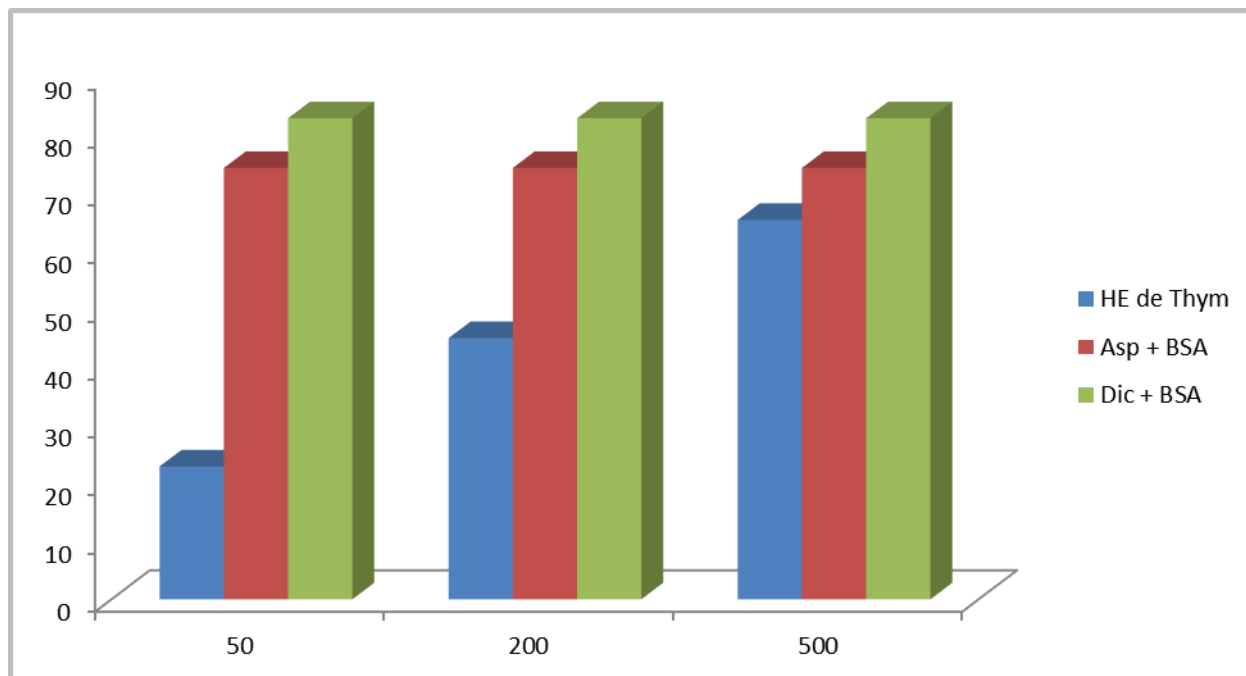


Figure. III.13 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique par l'HE de Thym

❖ Discussion :

La **figure III.13** montre que l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* présente un pouvoir inhibiteur de la dénaturation des BSA qui augmente lorsque la concentration de l'HE augmente. Le pourcentage d'inhibition de l'HE atteint un pourcentage de 65.36% pour une concentration en HE de 500 µg/ml. Cependant, ce pourcentage reste inférieur à celui du diclofenac et de l'aspirine, qui présentent respectivement des pourcentages d'inhibition de 82.88% et 74.32%. L'activité inhibitrice de la dénaturation d'ovalbumine et de BSA est peut être attribuée à la présence de phénols, plus précisément le carvacrol, qui est connu pour son effet anti inflammatoire.



Conclusion
Générale



Conclusion Générale

Conclusion Générale

Le travail effectué, est axé sur l'extraction et la caractérisation de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* récolté dans la région de Ain Defla. L'étude réalisée comprend l'optimisation du rendement d'extraction, la caractérisation physicochimique et la détermination de la composition chimique de cette huile essentielle, ensuit l'activité antiacide et l'activité anti-reflux, ainsi que l'évaluation de l'activité biologique (notamment l'activité antimicrobienne et antioxydante et anti inflammatoire).

Nous avons tous d'abord procédé à l'extraction de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* par hydrodistillation, à partir des feuilles sèches et fraîches, et nous avons constaté que l'extraction de l'HE à partir des feuilles sèche donnait un meilleur rendement qui est de l'ordre de 3.34%. La cinétique d'extraction a montré que la quasi-totalité de l'huile essentielle est extraite au bout des 60 premières minutes. L'huile essentielle extraite est caractérisée par une odeur épicée, une couleur jaune foncée et un aspect liquide mobile,

L'étude des caractéristiques physicochimiques de notre huile essentielle a permis de mettre en évidence sa conformité aux normes établies, elle se distingue par une densité relative, un indice de réfraction, un indice d'acide, indice d'ester et pH comparable à ceux donnés par la pharmacopée française, la norme AFNOR.

L'huile essentielle extraite a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). L'analyse réalisée a permis d'identifier les monoterpènes comme constituants majoritaires dominés par le thymol qui apparaît comme le constituant principal de l'huile essentielle (68.67%), suivi du γ -Terpinen (9.22 %), du benzene (7.71 %) et du Linalool L (2.88 %).

L'étude de l'activité antimicrobienne par la méthode de l'aromatogramme nous a permis de révéler l'action de l'huile essentielle sur 3 souches bactériennes. Les espèces bactériennes étudiées E.coli et Staphylococcus aureus sont très sensible à l'HE de *Thymus algeriensis* et le Pseudomonas Aeruginosa est peu sensible à l'HE.

L'activité anti-oxydante a été réalisée en employant le test du piégeage du radical libre DPPH. Les résultats obtenus montrent que notre huile essentielle présente une bonne activité anti-oxydante en comparaison à la vitamine C. La concentration d'inhibition de 50% du

Conclusion Générale

radical libre DPPH est de 11.19 µg/ml pour notre huile essentielle et 12.64 µg/ml pour la vitamine C d'où nous pouvons déduire que le pouvoir réducteur de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* est très bon.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire in vitro effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines a montré que l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* est un bon inhibiteur de l'activité inflammatoire avec des pourcentages de protections allant jusqu'à 65.06% pour l'inhibition de l'ovalbumine, et 65.36% pour l'inhibition de la BSA.

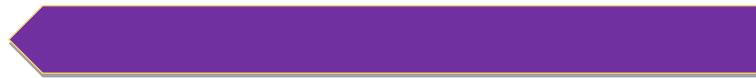
Enfin, nous avons pour perspective de compléter nos résultats par d'autres études plus approfondies tel que :

- L'extraction de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* par d'autres méthodes.
- L'étude de l'activité antivirale
- La formulation de pommade ou de crème à vertus anti-inflammatoire à base de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis*.



Références

Bibliographiques



Référence

- [1] Mpondo E., Paul Ngene J., Mpounze Som L., Etame Loe G., Ngo Boumsong P., Yinyang J., et al., (2017). Connaissances et usages traditionnels des plantes médicinales du département du haut Nyong. *Journal of Applied Biosciences*, 113: 11229-11245.
- [2] Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M., Hseini S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de zaër (Maroc occidental). *Lejeunia*, revue de botanique [en ligne], n° 186
- [3] Boudoumi, K. (2014). Etude de l'influence du lieu et de la période de récolte de l'espèce «*Thymus vulgaris* L. » sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles. Mémoire de Master. Université de Djelfa, Algérie.
- [4] Iserin, p. (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales*, 2 Ed. Larousse. Londres, pp 225-226.
- [5] Benini, C. (2007). Contribution à l'étude de la diversification de la production des huiles essentielles aux Comores. Mémoire d'Ingénieur. Université Gembloux, pp109.
- [6] Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales*. 3ème édition, Tec & Doc. Lavoisier, Paris, p 1120.
- [7] Garnero, J. (1991). Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. *Encyclopédie des médecines naturelles*. Paris, France. pp 2-20.
- [8] Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S et Abrini J. (2006). *Thymus essential oils : chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities*. Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc.
- [9] Alouache, F et Benmeziane, S. (2017). Etude comparative des activités biologiques des huiles essentielles et extraits volatiles (CO₂ supercritique) de plantes aromatiques du genre *Thymus*. Mémoire de Master, Université A. Mira, Béjaia, Algérie.
- [10] Benmadi, Z et Abida, H. (2018). Effet des extraits de *Thymus vulgaris* chez *Escherichia coli* responsable des infections uro-génitales. Mémoire de Master, Université Abdel Hamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie.
- [11] Habbi-Cherifi, A. (2014). Etude de la dynamique du parasite *Varroa destructor* de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) et évaluation de l'efficacité de quelques huiles essentielles dans la lutte contre ce parasite. Mémoire de Magister en Sciences Biologiques, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie

Référence

- [12] Remal, W et Khachouche,Z. (2017).Initiation à l'Elaboration d'une carte de répartition du genre *Thymus* et l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *Thymus Serpyllum* L. récoltée du massif Dahra Zaccar région d'El Amra -wilaya de Ain Defla. Mémoire de Master, Université El Djillali Bounaama, Khemis Miliana, Algérie.
- [13] Mouhi, L. (2017). Etude des activités biologiques de l'association des huiles essentielles de plantes de la flore Algérienne. Élaboration d'une forme pharmaceutique. Thèse de Doctorat, Univerité Houari Boumediene, Algérie.
- [14] Benbouali, M. (2006).Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de : "*Mentha rotundifolia* & *Thymus vulgaris*". Mémoire de Magister, Université Hassiba Ben Bouali –Chlef, Algérie.
- [15] Zeghib, A. (2013).Etude phytochimique et activités anti oxydante, anti proliférative, antibactérienne et antivirale d'extraits et d'huiles essentielles de quatre espèces endémiques du genre *thymus*. Thèse de Doctorat, Université de Constantine .Algérie.
- [16] Binate, G et Dikes, L. (2018).Etude de l'effet antibactérien et prébiotique des extraits de *Thymus vulgaris* et de *Thymus serpyllum*. Mémoire de Master, Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, Algérie.
- [17] Abdelli,W. (2017).Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris*. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem, Algérie.
- [18] Boulade, K. (2018). Lamiaceae : caractéristiques et intérêts thérapeutiques à l'officine. Thèse de Doctorat, Université Toulouse III, Paul Sabatier, France.
- [19] Stahl-Biskup, E et Saez, F. (2002). Thyme: The genus *Thymus*. London; New York, USA: Taylor & Francis.
- [20] Jalas J. (1971).Note of *Thymus* .L (Labiatae) in Europe. I. Supraspecific Classification and Nomenclature. Bot .J. Linn.Soc, 64 :199-215.
- [21] Quezel, P et Santa, S. (1963).Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales - Tome2.
- [22] Benayache, F. (2013). Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret. Mémoire de Master, Université Constantine 1, Algérie.
- [23] Mebarki, N. (2010)., Extraction de l'huile essentielle de *thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse antimicrobienne.
- [24] Djedir, G. (2018).Etude comparative entre deux espèces du Thym: *Thymus coloratus* et

Référence

Thymus capitatus dans la région de Tlemcen : Aspect écologique, cartographique et morphométrique. Master, Université Aboubakr Belkaid, Tlemcen, Algérie.

[25] Nicola S, Fontana E et Hoeberechts, J. (2002). Cultural techniques to optimize the thyme (*Thymus vulgaris*) propagation. In XXVI International Horticultural Congress: Issues and Advances in Transplant Production and Stand Establishment Research. 631: 187–192.

[26] Iapichino G, Arnone C, Bertolini M, et Amico Roxas U. (2006). Propagation of three *Thymus* species by stem cutting. *Acta Horticulturae*. 723: 411-414.

[27] Baranauskiene R, Venskutonis P. R, Viškelis P et Dambrauskiene, E. (2003). Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(26): 7751–7758.

[28] Belaqqiz, R., Bahri, F., Romane, A., Antoniotti, S., Fernandez, X et Dunach, E. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of the different parts of *Thymus maroccanus* Ball: An endemic species in Morocco. *Natural Product Research*. 27(18): 1700–1704.

[29] Sotomayor J. A, Martinezm R. M, Garcia A. J et Jordan M. J. (2004). *Thymus zygis* subsp. *Gracilis*: Watering level effect on phytomass production and essential oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(17): 5418–5424.

[30] Hassanali N. B., Darab Y, Ali S. M, et Nazari F. (2004). Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops Products*. 19(3): 231–236.

[31] Benazzedine, S. (2010). Activité insecticide de cinq huiles essentielles vis-à-vis de *Sitophilis oryzae* (Coleoptera ;cuculionidae) et *Tribolium confusum* (Coleoptera ; Tenebrionidae). Mémoire on line, Ecole nationale supérieure agronomique, El Harrach, Algérie.

[32] Kabouche, A. (2005). Etude photochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. Thèse de Doctorat d'état en chimie, Université Mentouri Constantine, p 277.

[33] Lavergne, D. (2012). Guide technique des plante à parfum aromatiques et médicinales (PAM) en bio, rédaction : AGROBIO 47 Association de Développement de l'Agriculture Biologique

[34] Kholkhal, F. (2014). Etude Photochimique et Activité Anti oxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*. Thèse de Doctorat en Biologie, Université- Abou Bakr Belkaid ,Tlemcen,139p.

Référence

- [35] Yazid CH et Mohamed El-Amine M (2021). Etude de la relation entre les principes actifs et leurs , effets thérapeutiques de quelques plantes médicinales ; mémoire de master , Université ,M'hamed bougara boumerdes
- [36] Daidj, N. (2007).L'évolution des chaines de valeur dans le secteur des jeux vidéos. Edition Mutanier des STIC. Acteurs, Ressources et Activité, Paris, p193-221.
- [37] Djeroumi, A et Nacef, M. (2004).100plantes médicinales d'Algérie. Ed Palais du livre, pp 135 -131.
- [38] Mayer, F. (2012).Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite. Thèse pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, p 17.
- [39] Baba Aissa, F. (1990).Les plantes médicinales en Algérie, édition le monde des pharmaciens, p173.
- [40] Haddouche, K.H. (2011).Etude de l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus*. Mémoire de Master, Université, Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Algérie
- [41] Frederich, M. (2014).Les plantes qui nous soignent: de la tradition à la médecine moderne, centre inter facultaire de recherche du médicament. Chargé de cours à la faculté de médecine, université de Liège, p 62.
- [42] Saidj, F. (2007). Extraction des essences du *Thymus numedius kabylliica*. Thèse de Doctorat, Université M'hamed Bougara,Boumerdès, Algérie
- [43] Nouioua, W. (2012).Biodiversité et ressources phylogénétiques d'un écosystème forestier « *Paeonia mascula* (L.) Mill.». Thèse de Magister en Biodiversité et Gestion des Ecosystèmes, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie.
- [44] Daoudi, F. (2016).Analyse chimique et propriétés biologiques des huiles essentielles de *Chiliadenus rupestris* et *Thymus coloratus* (Zaater) de la région de Tlemcen. Thèse de Master en chimie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie, p 7-11.
- [45] Qaralleh H.N., Abboud M.M., Khleifat K.M., Tarawneh K.A., et Al Thunibat O.Y.(2009).Antibacterial activity in vitro of *Thymus capitatus* from Jordan. *Revue de Pak J Pharm Sci*, 22(3):247-51.
- [46] Benteyeb, A et Djemmal, S. (2014).Contribution à la mise en évidence in vitro de l'efficacité des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* et *Thymus dreatensis* contre les champignons lignivores, Mémoire de Master en microbiologie, université Constantine 1.

Référence

- [47] Zrira, S. (2000). Marché des plantes aromatiques des plantes aromatiques et médicinales au Maroc, Cour, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B.P. 6202, Rabat, Maroc, p 2-3.
- [48] Sidali .L (2019) Etude de l'extraction et de la valorisation des huiles essentielles de plantes endémiques Algériennes : espèces *Thymus fontanesii* Mémoire de Doctorat, Université El Djillali Bounaama, Khemis Miliana, Algérie
- [49] Amiri H .(2012). Essential oils composition and antioxidant properties of three *Thymus*, species. evidence-based complementary and alternative medicine. 728065.
- [50] Nickavar B, Mojab F, Dolat-Abadi R. (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. Food Chemistry. 90: 609-611.
- [51] Höferl M, Buchbauer G, Jirovetz L. (2009). Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. Journal of Essential Oil Research. 21: 459-463.
- [52] ESCOP Monographs. (2007). The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. The European Scientific Cooperative on Phytotherapy in collaboration with Georg Thieme.
- [53] Marino, Marilena, Bersani, Carla, Comi, et al. (1999). Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus vulgaris* L. Measured Using a Bioimpedometric Method. Journal of Food Protection. 62: 1017-23.
- [54] El-Nekeety A A, Mohamed S R, Hathout A S, Hassan N S, Aly S E, et al. (2011). Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induce oxidative stress in male rats. Toxicon. 57: 984-991.
- [55] Ložienė, K., J. Vaičiūnienė, and P.R. Venskutonis, (1998), Chemical composition of the essential oil of creeping thyme (*Thymus serpyllum* sl) growing wild in Lithuania. *Planta medica*,. 64(08):p. 772-773.
- [56] Mata A. T, Proença C, Ferreira A. R, Serralheiro M. L. M, Nogueira J. M. F et Araujo M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. Food Chemistry. 103: 778-786.
- [57] Rota M C, Herrera A, Martinez R. M, Sotomayor J.A et Jordan M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgrais*, *Thymus Zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food control. 19: 681-687.
- [58] Özcan M et Chalchat J.-C. (2004). Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. Bulgarian Journal of Plant Physiology. 30(4): 68-73.

Référence

- [59] Tepe B, Sokmen M, Akpulat H. A, Daferera, D, Polissiou M et Sokmen A. (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*. 66 (4), 447-454.
- [60] Bouguerra N, Tine Djebbar F et Soltani N. (2017). Algerian *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and larvicidal activity against the mosquito *Culex pipiens*. *Inetrerantional journal of mostquito Research*. 4(1): 37-42.
- [61] Bounatirou S, Smiti S, Miguel M. G, Faleiro L, Rejeb M. N, Neffati M, Costa M, Figueiredo A, Barroso J et Pedro L. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry*. 105 (1): 146-155.
- [62] Bekhechi C, Bekkara F. A, Abdelouahid D. E, Tomi F et Casanova J. (2007). Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. from Algeria. *Journal of essential oil research*. 19 (6): 594-596.
- [63] Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T et Chelghoum C. (2006). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii*. *Pharm. Biol*, 44 (8): 607-612.
- [64] Ghannadi A, Sajjadi S. E et Kabouche A. (2004). *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut.- A potential source of thymol-rich essential oil in North Africa. *Z. Naturforsch.*, 59 (3-4): 187-189.
- [65] Aouati K, Mebarki N, Ayadi A, Chader H, Nabiev M et Mansouri, M. (2011). Évaluation de l'activité antidermatophytique d'une formulation pâteuse à base de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, Elsevier Masson. A193.
- [66] Arvy MP, Gallouin F. *Épices, aromates et condiments*. Édition Clerc- Saint- Amand-Montrond. N d'édition : 003063-02.2007. France.
- [67] A. Zhiri, D. Baudoux. *HUILES ESSENTIELLES CHÉMOTYPÉES ET LEURS SYNERGIES*. Edition Inspir Development. Luxembourg.
- [68] Grunwald J, Janicke C. (2006) *Guide de la PHYTOTHERAPIE*. 2ème édition. Edition MARABOUT. Italie .
- [69] Wichtl M, Anton R. (2003), *PLANTES THERAPEUTIQUES* tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2ème édition. Edition Tec et Doc.

Référence

- [70] AFNOR ,2000. Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1.Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p. ; AFNOR, 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR.Paris. 57 p
- [71] Bruneton J., 1993. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2ème Ed. Lavoisier, 385-623
- [72] Anton et Lobstein, 2005
- [73] Fahn 1988
- [74] Bernardet al. 1988
- [75] Conception et application à l'extraction des huiles essentielles, université d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, l'Institut National Espèces Salivia, Lavandula et Mentha du Maroc(1948), Faculté des Sciences de Rabat, espèces. Tome III, Paris 803-810
- [76] Chaker El Kalamouni, Thèse sur : Caractérisations chimiques et biologiques
- [77] Mohamdi Zohra, 2005-2006, Thèse sur : Etude du pouvoir et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, Université Abou Baker belkaïd Tlemcen faculté des sciences, ,89-92.
- [78] Rouessac F., Rouessac A., Brooks S., 2007,Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques, Ed. John Wiley and Sons, , p.31.
- [79] Mendham J., Vogel A.I, Denny R.C., Toullec J., Barnes J., Barnes J.D., Mottet M., Tomas M.J.K (2005), Analyse chimique quantitative de Vogel, Ed. De Boeck Université, , p.231-314.
- [80] Burgot G., Burgot J. L, 2011, Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : Méthodes chromatographiques électrophorèses, méthodes spectrales et methods thermiques, 3ème Edition Tec & Doc Lavoisier, p.10, ISBN : 978-2-7430-1337-0.
- [81] Benabdelkader, T. (2012). Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, Lavandula stoechas sensu lato, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Mémoire de Doctorat, Ecole Normale Supérieure, Kouba-Alger, Algérie.
- [82] Ouis, N. (2015). Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fe nouil et de persil. Thèse de Doctorat, Université d'Oran 1, Algérie.
- [83] Sutour, S. (2010).Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats. Mémoire de Doctorat, Université de corse pascal Paoli.
- [84] Franchomme P, Pénéol D -1990 , Matière médicale aromatique fondamentale-L'aromathérapie exactement ; Roger Jallois éditeur ; Limoges, Vol. 4 ; pp 317-446.

Référence

- [85] Silou T, Malanda M, Loubaki L, 2004; - Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce à un plan factoriel complet 2^3 -Journal of Food Engineering; Vol 65 ; pp 219–223.
- [86] Bruneton J, "Pharmacognosie, 1999, Phytochimie, Plantes médicinales, monoterpènes et sesquiterpènes ; Tec & Doc, 3eme édition, pp 484-497. Lavoisier. Paris.
- [87] Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Abdelouahid D.E, 2008, Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie- Phytothérapie ; Vol. 6; pp 153–159..
- [88] Fellah S, Romadhane M, Abderraba M. 2006, Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*.L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie - Journal de la Société Algérienne de Chimie J. Soc. Alger. Chin.; Vol. 16 ; N°2; pp 193-202
- [89] Senhaji O, Faid M, Kalalou I;2006, Etude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de cannelle –Phytothérapie; Vol. 1 ; pp 24–30.
- [90] Marzouk Z, Neffati A, Marzouk B, Chraief I, Khemiss F, Chekir Ghedira L, Boukef 2006,K,Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. oil from Kasrine- Journal of Food Agriculture & Environment; Vol.4; N°3-4 ; pp 61-65.
- [91] Atmani-Merabet, G. (2019). Huiles essentielles de trois espèces d'*Eucalyptus* d'Algérie : composition et activité acaricide (*Varroa destructor*). Thèse de doctorat. Université Des Frères Mentouri Constantine1, Algérie
- [92] Laurent, J. (2017). Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine. Mémoire de Doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse , France.
- [93] Sarni, T et Yelles, D. (2017). Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cedrus atlantica* et *Origanum compactum* : application sur la tomate. Mémoire de Master, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.
- [94] Baba-Moussa F., 1999. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. J ethnopharmacol; 66 p: 335-338 ,Boysen et al., 2000; Hageskal et al., 2006
- [95] Mayer G.B., 1989.Produits PFI- CO₂, une nouvelle génération de produits pour l'alimentation extraits au CO₂. Industries Agro-Alimentaires, 847-853
- [96] Pellerin P., 2001. Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. Annales des Falsifications, de L'Expertise Chimique. 94, 51-62

Référence

- [97] H.Tahraoui, E.Si mohammed, W.Yakhlef, .2020 ; « Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la plante médicinale *Laurus nobilis* de la région d'Ain Temouchent ». Pour l'obtention du Diplôme de Master en Science Biologique.universitaire Belhadj BouchaiB d'aïn-Témouchent ,
- [98] Y.Nishii, T.Yoshida et Y.Tanabe , 1997, « Enantiomeric resolution of a germacrene-D derivative by chiral highperformance liquid chromatography. *Biosci.Biotech.Biochem* ».
- [99] Marie Elisabeth Lucc, 1982 , thèse sur : Extraction sans solvasnt asistée par MicroondesMaroc ,18-22
- [100] T.Hessas, S.Simoud , 2018, « Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus sp* » mémoire de doctorat en pharmacie. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou,
- [101] Longevialle, 1981 Constantin, 1996
- [102] Elhaib A., 2011, Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformationcatalytique [thèse] Toulouse : Université de Toulouse.
- [103] Lacoste S. 2014, Ma bible de la phytothérapie [magazine]. Edition : Quotidien Malin,
- [104] <http://morike.crifpe.ca/telechargements/pdf/bakk.pdf>
- [105] Hernandez-Ochoa, 2005
- [106] Hellal.Z, 2011,Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et Antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la Sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.
- [107] El Kalamouni C. 2010. Caractérisation chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. 263p
- [108] Piochon M.2008. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Université de Québec, Chicoutimi. 213 p.
- [109] Kalembe D, Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10 (10): 813 - 829.
- [110] Carson C.F, Rilley T.V, Bosque F.2002. Antimicrobial activity of the major components of Essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology* 78 (3): 264 - 269.

Référence

- [111] Cox S.D, Mann C.M, Markham J.L, Bell H.C, Gustafson J.E, Warmington J.R and Wyllie S.G.2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: 170 - 175
- [112] Daferera D.J, Ziogas B.N, Polissiou M.G.2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection* 22 (1) : 39 - 44.
- [113] Comhair S.A.A, Erzurum S.C.2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 283 (2): 246- 255.
- [114] Muster, D, (2005). *Médicaments de l'inflammation*. EMC-Stomatologie, 21.
- [115] Adepo Apie Annick, (2018). Présentée en vue de l'obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie, Evaluation des activités anti-inflammatoire et antioxydant de l'extrait hydro-éthanolique de l'écorce de racines de *Dichrostachys cinerea* L. Wight et Arn. (Fabaceae), administration et personnel enseignant de UFR l' sciences pharmaceutique et biologique , 8-9, 13-15.
- [116] P.Franchomme, D. Peoel, 2001, *L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles*. R. Jollois.
- [117] R.Guba: 2001 « Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential ». *International Journal of Aromatherapy.*, 11, 76-83.
- [118] G.Chabert, 2013 « myrtacées et aromathérapie », mémoire docteur en pharmacie Faculté de pharmacie de Grenoble, Université Joseph Fourier,.
- [119] Richard, J. A. 1999, *Toxicology Brief*.
- [120] Alessandra Moro Buronzo, grande guide des huiles essentielles santé beauté Marocaine : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires
- [121] Seu-Saberno, M. ; Blakeway, J. 1984, « La mouche de chêne, une base de la parfumerie », *Pour la science*, Edition Française de Scientific American, Mai, 83.
- [122] Teissedre, P.L; Waterhouse, A. L. J. *Agric. Food Chem.* 2000, 48, 3801-3805; b) Ismaili Alaoui, M. et Bendjilali, B. 1er Séminaire Magrebin sur les plantes aromatiques, Tlemcen le 29-31Mai, 1990; c) Latloui, N. et Tantaoui-Elaraki, A. J. *Essent. oil Res.*1994, 165.
- [123] Richard F., 1992. *Manuel des corps gras*, Paris, Ed. Lavoisier, Tec. Et Doc., 1228-1242

Référence

- [124] Richard H., 1992. Epices et aromates. Ed. Technique & Documentation - Lavoisier, Paris, 339
- [125] Anonyme, 2005. Huile Essentielle: principales propriétés et caractéristiques. www.penntybio.com/huile
- [126] . C.Briot: 2016, « Le laurier noble, plante des heros : Aspects historiques, botaniques et thérapeutiques » thèse de doctorat université De Lorraine ,
- [127] R.Randriandivelo « Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar « *Cinnamosma fragrans* », 2010, Alternative aux antibiotiques en agriculture », thèse de doctorat biochimie, faculté des sciences, Université Antananarivo,
- [128] <http://lecolebuissonniere.eu/page114.html>
- [129] Fekih, N., 2015, Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie.
- [130] Djrourou, M et Habouchi, S. (2018). Etude de l'activité insecticide des extraits méthanoliques et huiles essentielles de *Sinapis arvensis* et *Thymus vulgaris* sur les larves de *Aphis spiraeicola* (Patch). Mémoire de Master, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, Algérie.
- [131] Aomari, L et Sehaki, C. (2018). Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de thym. Caractérisation et évaluation de l'activité antimicrobienne. Mémoire de Master, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie.
- [132] Nedjai, I. Nedjai, S. (2017). Activité antimicrobienne des huiles essentielles. Mémoire de Master, Université A. MIRA – Bejaia, Algérie.
- [133] Hassani A., Sehari N., Sehari M., Bouchenafa N.1., Labdelli F., Kouadrie M. (2017). Etude des propriétés insecticides et bactéricides de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. dans la lutte contre les ravageurs des semences et denrées stockées. Revue Écologie-Environnement (13), ISSN: 1112-5888
- [134] Ahmia, S et Fethallah, F. (2020). Inventaire de quelques Lamiacées et caractérisation de l'huile essentielle de Thym (*Thymus vulgaris*) dans différentes régions. Mémoire de Master. Université de Blida1, Algérie.
- [135] Shazia S., Muzafar G., Wagay. (2011). Essential oil composition of *thymus vulgaris* L. and their uses. *J. Essent. Oil Res.*, 16: 69-74.
- [136] El-akhal H., Greche F., Ouazzani Chahdi R., Guemmouh A., El Ouali Lalami A. (2015). Chemical composition and larvicidal activity of *Culex pipiens* essential oil of *Thymus*

Référence

- vulgaris grown in Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(1): 214-219.
- [137] El ouali lalami A., El-AKhal F., Ouedrhiri W., Ouazzani Chahdi F., Guemmouh R., Greche H. (2013). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain: *Thymus vulgaris* et *Thymus satureioidis*. *Les technologies de laboratoire*, 8: 31.
- [138] Satyal P., Murray B.L., McFeeters R.L., Setzer W.N. (2016). Essential Oil Characterization of *Thymus vulgaris* from Various Geographical Locations. *Foods*, 5, 70.
- [139] Alexandre, P et Ronoel, L.O. (2008). Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (thyme) essential oil from the Rio de Janeiro state. *Journal of the Serbian chemical society*, 73(3): 307-310.
- [140] Benaziza, D et Benhalima, Y. (2017). Etude de l'activité antibactérienne de certaines huiles essentielles sur un des agents responsables de Scombrotisme (*Klebsiella pneumoniae*). Mémoire de Master, Université Djilali Bounaama, Khemis Miliana, Algérie.
- [141] Soto-Mendívi E., Moreno-Rodríguez J., Estarrón-Espinosa M., García-Fajardo J., Obledo-Vázquez N. (2006). Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. *e-Gnosis [online]* Vol. 4, Art. 16.
- [142] Elgamouz S., Bouzekri O., Bouymajane A., Rhazi Filali F., Elidrissi M., Amchrouk A., Chokrad M. (2020). The Study of Antioxidant and Antimicrobial activities of Moroccan *Thymus vulgaris* Essential oil and its Physicochemical Characteristics in comparison with previous Studies. *Rhazes: Green and Applied Chemistry*, Vol. 10, 103~112.
- [143] N.Methanni, M.E. Benabdelkader, 2016 , « Contribution à l'étude des propriétés physico-chimiques et l'activité antifongique des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques et médicinales » Doctoral dissertation, Université de Jijel.
- [144] k.Taleb-Toudert, , 2015, « Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien), Evaluation de leurs effets sur le bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : bruchidae) », Thèse Doctorat
- [145] Dehoffman E., Charette J. et Stroobant V. (1994), *Spectrométrie de masse*, Masson, Paris, 341 p
- [146] Khiredine, 2013, Hamida Comprimés de poudre de dattes comme support universel Des principes actifs de quelques plantes médicinales d'Algérie. Mémoire de Magister, Faculté des Sciences de l'Ingénieur, Boumerdes,.

Référence

- [147] Benabed K H., Gourine N., Ouinten M., Bombarda I., Yousfi M. (2017). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Three Algerian Lamiaceae Species. *Current Nutrition and Food Science*, Bentham Science Publishers, 13 (2), pp.97 – 109.
- [148] Brada M., Achour D., Wathelet J.P., Lognay G. (2009). Study of Essential Oils of Some Plants from Algeria (*Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris* and *Ruta chalepensis*).
- [149] Benachenhou, R et Sahari, I. (2020). Valorisation des huiles essentielles du Thym en Aromathérapie. Mémoire de master, Université Blida 1, Algérie.
- [150] Lakhder, L. (2015). Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur aggrégats bactériens actinomycètes comitants : Étude in vitro. Thèse de Doctorat, Université de médecine dentaire de Rabat, Maroc.
- [151] Ducrotté, P. (1999). Traitement du reflux gastro-oesophagien : Règles hygiéno-diététiques et topiques. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 23(1BIS),S70-S77
- [152] Meining, A., & Classen, M. (2000). The role of diet and lifestyle measures in the pathogenesis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *The American journal of gastroenterology*, 95(10), 2692-2697]
- [153] R.Labioud, 2016, « Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité anti-oxydante et activité fongicide » Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar- Annaba.
- [154] L.Kachetel, A.Sahmi , 2016 « Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des fruits de *Coriandrum sativum* L ». Mémoire de master Université UMMTO.
- [155] C.Sanchez-Moreno, 2002. « Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems ». *Int. Journal of Foods Sci. Tech.* 8: 121-137.
- [156] W.Brand-Williams, M.E.Cuvelier, C.Berset , 1995, « Use of free radical method to evaluate antioxidant activity », *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30,
- [157] Bélilia, B.M., 2011, Optimisation des procédés d'extraction de l'huile essentielle du thym et activité antimicrobienne., Université M'hamed Bougara de Boumerdès.
- [158] Boukhatem M., Ferhat M., Kameli A., Saidi F., Taibi H., Djamel T. (2014). Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris* L.) en aromathérapie anti-infectieuse. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 8:1418-1431.

Référence

- [159] Golmakani, M. T., & Rezaei, K. 2008, Comparison of microwave assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. Food Chemistry, 109, 925–930,.
- [160] Lazouni H.A., Benmansour A., Taleb-Bendiab S.A., Chabane Sari D. (2007). Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du *Foeniculum vulgare* Mill. Sciences & Technologie, 25: 7-12.
- [161] Zeghad et Merghem, 2013 Antioxidant and Antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. j. Biol.-Plant, 58:27-36.
- [162] Benabed K H., Gourine N., Ouinten M., Bombarda I., Yousfi M. (2017). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Three Algerian Lamiaceae Species. Current Nutrition and Food Science, Bentham Science Publishers, 13 (2), pp.97 – 109.
- [163] Ismaili R, Houbairi S, Lanouari S, Moustaid K, Lamiri A. (2017). Etude De L'Activité Anti oxydante Des Huiles Essentielles De Plantes Aromatiques et Médicinales Marocaines. European Scientific Journal, 13(12): 1857 – 7881.
- [164] Zantar S., El Garrouj D., Pagan R., Chabi M., Laglaoui M., Hassani Z.M. (2015). Effect of harvest time on yield, chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* essential oils. Eur. J. Med. Plants, 8(2): 69-77.
- [165] . Boukrif, R et Boukabous, S. (2019). Etude de l'activité antibactérienne de *Thymus vulgaris*. Mémoire de Master, Université de Bouira, Algérie.