

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA BOUMERDES
FACULTE DES HYDROCARBURES ET DE LA CHIMIE



Département : Génie des Procédés Chimiques et Pharmaceutiques

Laboratoire de Synthèse Pétrochimique

MEMOIRE

Présenté par :

Melle **MEBARKI NOUDJOUR**

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE

**MAGISTER EN GENIE DES PROCÉDES CHIMIQUES ET
PHARMACEUTIQUES**

Option : Industrie Pharmaceutique

THEME :

**Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*
et application à la formulation d'une forme
médicamenteuse - antimicrobienne**

Soutenu publiquement devant le jury :

Mr. HAMMOUDI Khaled	Professeur	UMBB	Président
Mr. NABIEV Mohamed	Professeur	UMBB	Rapporteur
Mr. HAMADA Boudjema	Professeur	UMBB	Examineur
Mr. MOULAY Nadji Mostefa	Professeur	CU Médéa	Examineur
Mme. HALOUANE Fatma	Maître de Conférences (A)	UMBB	Examinatrice
Mme. FAZOUANE Fethia	Maître de Conférences (A)	UMBB	Examinatrice

Boumerdès 2010

Remerciements

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

*J'ai eu la chance d'effectuer ce travail minutieux dans trois laboratoires de recherche, au «Laboratoire de Traitement des Eaux et Extraction des Substances Biologiquement Actives» du Département de Génie des Procédés Chimiques et Pharmaceutiques de Boumerdes, sous la direction de Monsieur **M. Nabiev** Professeur au sein de ce Département, au Centre de Recherche et de Développement C.R.D – SAIDAL ainsi qu'au Laboratoire National de Control des Produits Pharmaceutiques d'Alger (L.N.C.P.P), sous la direction de Messieurs **Nabiev** et **Chader**.*

*Tout d'abord, je remercie sincèrement Monsieur le Professeur **Nabiev**, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour m'avoir accordé sa confiance et guidé dans mon travail tout au long de ces années. Ses compétences, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche dans son laboratoire. J'ai trouvé en lui un directeur toujours disponible et ouvert.*

*J'exprime mes respectueux remerciements à Monsieur le Professeur **K. Hammoudi**, Professeur au Département Génie des Procédés Chimiques et Pharmaceutiques de l'Université de M'hamed Bougara à Boumerdes pour son soutien, sa disponibilité, son intérêt pour ce travail et pour les nombreux conseils avisés qu'il a pu me donner tout au long de la thèse aussi bien pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de soutenance.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur **B. HAMADA**, Professeur au Département Génie des Procédés Chimiques et Pharmaceutiques de l'Université de M'hamed Bougara –Boumerdes, aussi bien pour son aide et ses encouragements et pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je tiens à exprimer également ma reconnaissance à Monsieur le Professeur **N.M. MOULAY**, Professeur au Centre Universitaire de Médéa aussi bien pour son aide et pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je remercie Madame **F. Halouane** Maitre de Conférences et Chef de Département de la Biologie à la Faculté de Sciences, Université de M'hamed Bougara – Boumerdes, pour sa disponibilité, son aide, ses encouragements et pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Je tiens à remercier également Madame **F. Fazouane**, Docteur à la Faculté des Sciences au Département de la Biologie de l'Université de M'hamed Bougara à Boumerdes pour son aide et d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Monsieur **Chader**, Maître Assistant à la Faculté de Médecine et de Pharmacie à Alger, je tiens à vous remercier pour m'avoir accueillie dans votre groupe. Je vous suis très reconnaissante pour la confiance que vous m'avez accordée. Votre gentillesse, votre disponibilité, vos encouragements, ainsi que votre présence pendant les moments difficiles m'ont été indispensables.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Docteur **M. Kacir**, Vice-Doyen chargé de la post-Graduation, de la recherche scientifique et des relations extérieures de la Faculté des Hydrocarbures et de chimie à Boumerdes pour son aide et tous ses précieux conseils.

Un grand merci à toute l'équipe du Laboratoire Giologie de Centre de Recherche et Développement C.R.D – **SONATRACH** à Boumerdes pour leurs accueils à chaque fois chaleureux et amical: Madame **Moulain**, Mademoiselle **Bousslah**

Madame **Saibi** je vous remercie pour tous les conseils que vous m'avez apportés et aussi je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour les heures investies dans la correction du présent manuscrit ainsi que votre gentillesse, votre disponibilité, et vos encouragements.

J'adresse encore mes remerciements à tous les membres des Laboratoires de Microorganismes et d'Huiles Essentielles de C.R.D – **SAIDAL** en particulier Mlle **Haddad** et Madame **Halli Latifa** et Madame **Nazli** pour leur sympathie, leurs conseils et leurs aides. Ils ont contribué par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable.

Je tiens à remercier toute l'équipe du Laboratoire Pharmaco-Toxicologie de **LNCPP**, en particulier les deux pharmaciennes **Kahina** et **Amira** qui m'ont apporté une aide précieuse. Vous avez su faire partager votre expérience et vous m'avez guidée dans le monde de la recherche scientifique. Merci d'avoir cru en moi. Merci également aux personnels techniques de laboratoire pour leur aide au cours de ce travail

J'exprime ma reconnaissance à tous les Enseignants et Etudiants en Post-Graduation à Boumerdes pour leur encouragement et leur amitié, et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce modeste travail.

Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde mes chers parents qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras.

A la mémoire de mon grand-père et mes grand-mères qui m'a toujours aimé et comblé par ses bénédictions, que dieu le tout puissant les accueillent en son vaste paradis.

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

-Mes très chers frères Mohamed, Rezki, Khaled et Abdelouahab (surtout à toi Mohamed)

-Mes très chères sœurs Karima, Kenza, Amel et Amina

-Mes chers oncles, tantes, cousins et cousines.

- Ainsi que pour tous mes amis et mes collègues.

ملخص

تعد التعفنات الميكروبية من الأمراض الخطيرة والتي يزداد انتشارها في السنوات الأخيرة بطريقة واسعة ويرجع السبب الرئيسي في ذلك الى الاستعمال المفرط للمضادات الكيميائية للبكتيريا و الفطريات التي تصيب الانسان و أيضا الحيوانات و الذي نتج عنه تشكل جذوة ميكروبية مقاومة. من جهة أخرى، استعمال الزيوت الطيارة و مركباتها كمضادات للمكروبات اثبت في كثير من البحوث والدراسات، لهذا السبب وفي إطار استغلال النباتات الجزائرية اهتمامنا كان منصبا على عائلة لمياسية (LAMIACEES) و التي تعد من العائلات الأكثر استعمالا عالميا كمصدر للتوابل و المستخلصات الأقوى كمضادات للمكروبات وقد وقع اختارنا على نوع من أنواع الزعتر الا و هو «الزعتر»، أصلها من منطقة الاخضرية. زيادة لوفرتها و كثرة استعمالها، هذا النوع قليل الدراسات عليه. في هذا المجال نهدف من خلال هذا العمل المتواضع إلى إبراز و توضيح فعالية مركبين صيدليين ضد الجراثيم المجهرية التي تصيب جلد الانسان، الأول على أساس الزيت الطيار للزعتر و الآخر على أساس التيمول المستخلص من الزيت الطيار. هذه الفعالية درست على عدة بكتيريا و فطريات و أيضا على الفطريات المسؤولة عن الفطار الجلدي البشري ، الدراسات والتحليل اوضحت أن كلا المركبين المعالجين لديهما مجال فعل جد واسع و لديهما فعالية بكتيرية و فطرية اكبر بكثير على تلك التي تعطىها بعض المنتجات الموجودة في السوق و المستعملة كشاهد.

الكلمات المفتاح: الزعتر، الزعتر، الزيوت الطيارة، تمول، فعالية ضد الميكروبات، الفطريات الجلدية، الفعالية ضد الفطرية، التعفنات الميكروبية

Résumé

Les infections microbiennes restent des affections graves et leur fréquence a augmenté de façon considérable au cours des dernières années en raison de l'usage extensif des agents antibactériens et antifongiques chimiques dans la médication humaine ainsi que dans les élevages animaux qui conduit à la sélection de souches microbiennes résistantes. D'un autre coté, les huiles essentielles et leurs constituants ont une longue histoire comme agent antimicrobiens. A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, on s'est intéressé aux espèces de la famille des Lamiacées qui est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien. La plante sur laquelle a porté notre choix est une espèce de thym (*Thymus fontanesii*) provenant de la région de Lakharia; bien que relativement abondante et largement utilisée, cette espèce a été peu étudiée. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antimicrobienne de deux produits pharmaceutiques l'un à base de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et l'autre à base de son thymol extrait. Cette activité a été évaluée sur des bactéries, des levures et des dermatophytes responsables de mycoses humaines. Les deux produits testés présentent un spectre d'action très large et possèdent une très forte activité bactéricide et fongicide supérieure à celle des produits commerciaux vis-à-vis des microorganismes testés.

Mots clé: Thym, *Thymus fontanesii*, huile essentielle, thymol, activité antimicrobienne, dermatophytes, activité antifongique, infections microbiennes

Abstract

The microbial infections remain serious affections and their frequency increased in a considerable way during last years because of the extensive use of the agent antibacterial and antifungal chemical in human medication and that in the animal breeding which leads to the selection of resistant microbial stocks. Of another with dimensions, essential oils and their components have a long history like agent antimicrobial. To this end, and within the framework of the valorization of the Algerian flora, one was interested in the species of the

family of Lamiaceae which one of families is the used like world source of spices and extracts with strong antimicrobial capacity. The plant to which our choice related is a thyme species (*Thymus fontanesii*) coming from the area of Lakhdaria; although relatively abundant and largely used this species was studied little. In this context, the objective of this work is to highlight the antimicrobial activity of two pharmaceutical products one containing the essential oil of *Thymus fontanesii* and the other containing its extracted thymol. This activity was evaluated on bacteria, yeasts and dermatophyte fungal responsible of human mycoses. The two products tested present a very broad spectrum of action and have a very strong bactericidal activity and fungicide higher than that of the commercial products with respect to the micro-organisms tested.

Key words: Thyme, *Thymus fontanesii*, essential oil, thymol, antimicrobial activity, dermatophytes, antifungal activity, microbial infections

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....01

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES PLANTES MEDICINALES ET LES HUILES ESSENTIELLES

I.1 Généralités sur les plantes médicinales.....	04
I.2 Activité antimicrobienne de plantes aromatiques et médicinales.....	05
I.3 Huiles essentielles.....	05
I.3.1 Localisation des huiles essentielles dans la plante.....	06
I.3.2 Fonction biologique des HE.....	06
I.3.3 Composition chimique des huiles essentielles.....	06
I.3.4 Paramètres influençant la composition des plantes aromatiques.....	10
I.4 Biosynthèse des composés terpéniques.....	11
I.4.1 Définition.....	11
I.4.2 Classification.....	11
I.4.3 Biosynthèse des tetrépénoïdes dans le règne végétal.....	12
I.5 Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	14
I.5.1 Distillation.....	14
I.5.2 Extractions des produits actifs.....	15
I.6 Méthode d'analyse de la composition chimique des huiles essentielles.....	15
I.6.1 Méthodes d'analyses physiques et chimiques.....	16
I.6.2 Méthodes de détermination des constituants de l'huile essentielle.....	16
I.7 Présentation de la famille des Lamiacées.....	17

I.8 Thym.....	18
I.8.1 Historique.....	18
I.8.2 Caractéristiques botaniques.....	19
I.8.2.1 Description.....	19
I.8.2.2 Classification.....	20
I.8.3 Répartition géographique.....	20
I.8.3.1 Dans le monde.....	20
I.8.3.2 En Algérie.....	20
I.8.4 Huile essentielle du thym.....	22
I.9 Thymol.....	23
I.9.1 Biosynthèse du thymol.....	24
I.9.2 Extraction de thymol.....	26
I.10 Activité des huiles essentielles et de ces composés.....	26
I.10.1 Activités biologiques.....	26
I.10.1.1 Industrie alimentaire.....	26
I.10.1.2 Désinfection des locaux.....	26
I.10.2 Activités pharmacologiques.....	26
I.10.2.1 Activité antioxydante.....	27
I.10.2.2 Activité anti-inflammatoire.....	27
I.10.2.3 Activités antimicrobiennes des huiles essentielles.....	28
I.10.2.3.1 Activité liée à la composition chimique des HES.....	29
I.10.2.3.2 Type de microorganismes ciblés.....	31
I.10.2.3.3 Mode d'action antimicrobienne des huiles essentielles.....	31
I.10.3 Effet synergique entre les HES et d'autres substances antimicrobiennes.....	32
I.10.4 Aperçu sur les techniques d'étude du pouvoir antimicrobien des HE.....	32

CHAPITRE II: LA PEAU

II.1 Structure et fonctions de la peau.....	33
II.2 Epiderme.....	34
II.3 Absorption cutanée.....	36
II.4 Aspects qualitatifs et quantitatifs de l'absorption cutanée.....	37

II.5 Formes galéniques destinées à la voie cutanée.....	38
II.5.1 Préparations semi-solides pour application cutanée.....	39
II.5.1.1 Pâtes.....	39
II.5.2 Autres formes administrées sur la peau.....	39

CHAPITRE III: MICROORGANISMES ET PATHOLOGIES

III.1 Définition de microorganismes.....	40
III.2 Infections bactériennes.....	41
III.3 Infections fongiques.....	42
III.4 Dermatophytoses.....	43
III.5 Moyens de lutte contre les microorganismes pathogènes.....	45
III.5.1 Contre les champignons.....	45
III.5.2 Contre les bactéries.....	48

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES

IV.1 Objectif de travail.....	49
IV.2 Matériel chimique.....	49
IV.2.1 Analyse des constituants chimiques.....	49
IV.3 Matériel biologique.....	49
IV.3.1 Matériel végétal.....	49
IV.3.1.1 Description botanique.....	49
IV.3.1.2 Récolte et séchage.....	50
IV.3.2 Matériel animal.....	50
IV.3.3 Souches microbiennes testées.....	50
IV.3.3.1 Milieux de culture utilisés.....	51
IV.4 Extraction de l'huile essentielle.....	51
IV.4.1 Hydrodistillation.....	51
IV.4.2 Entraînement à la vapeur d'eau.....	52
IV.5 Calcul de rendement.....	52
IV.6 Extraction de thymol.....	53

IV.7 Analyse de l'huile essentielle et de son thymol extrait.....	53
IV.7.1 Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanes</i>	53
IV.7.2 Identification chimique de thymol extrait.....	53
IV.7.3 Analyse chromatographique d'HE et de son thymol extrait.....	53
IV.8 Formulation des pâtes.....	54
IV.9 Contrôles du produit fini.....	55
IV.9.1 Examen des caractéristiques macroscopiques.....	55
IV.9.2 Test de tolérance.....	56
IV.10 Tests microbiologiques.....	58
IV.10.1 Évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne.....	58
a- Pour les bactéries et les levures.....	59
b- Pour les dermatophytes.....	60
IV.10.2 Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle	61
a- Pour les bactéries et les levures.....	61
b- Pour les dermatophytes.....	62

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

V.1 Extraction des huiles essentielles.....	65
V.1.1 Résultats d'extraction par hydrodistillation.....	65
V.1.1.1 Influence du temps d'extraction sur le rendement en HE du <i>T.fontanesii</i>	65
V.1.1.2 Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	67
V.1.1.3 Caractères organoleptiques et indices physico-chimiques.....	72
V.1.1.4 Discussion.....	73
V.1.2 Entraînement à la vapeur d'eau.....	75
V.1.2.1 Etude cinétique.....	75
V.1.2.2 Caractéristiques organoleptiques et indices physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	76
V.1.2.3 Composition chimique des huiles essentielles.....	76
V.1.2.4 Influence du temps d'extraction sur la composition de l'HE de <i>T.fontanesii</i>	79
V.1.3 Etude comparative.....	83
V.1.3.1 Etude cinétique : Suivi du rendement.....	83
V.1.3.2 Composition chimique de l'huile essentielle.....	84

V.1.3.3 Influence de la technique d'extraction sur la teneur en composés phénoliques extraits.....	87
V.1.3.4 Constantes physico-chimiques.....	87
V.2 Résultat de l'extraction de thymol.....	88
V.2.1 Par cristallisation sous l'action du froid.....	88
V.2.2 Par extraction chimique.....	89
V.2.3 Identification de thymol extrait.....	89
V.2.4 Confirmation des structures du thymol extrait par CPG / MS.....	90
V.3 Résultats de la formulation des pâtes.....	90
V.3.1 Résultat de contrôle de la matière première.....	90
V.3.2 Résultats de préparation.....	90
V.4 Contrôles des produits finis.....	91
V.4.1 Examen des caractéristiques macroscopiques des deux pâtes.....	91
V.4.1.1 Essais galéniques.....	91
V.4.1.2 Homogénéité.....	92
V.4.1.3 Mesure du pH.....	92
V.4.2 Essai de la tolérance locale.....	92
V.4.2.1 Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée de la pâte de l'HE.....	93
V.4.2.2 Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée de la pâte de thymol.....	95
V.4.3 Discussion.....	96
V.5 Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne.....	97
V.5.1 Pour les bactéries et les levures.....	97
V.5.2 Pour les cératophytes.....	103
V.6 Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>T.fontanensii</i>	105
V.6.1 Pour les bactéries et les levures.....	105
V.6.2 Pour les dermatophytes.....	107
V.7 Discussion.....	109
CONCLUSION GENERALE.....	116
GLOSSAIRE.....	119
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	124
ANNEXES	

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Activités biologiques de certains composés terpeniques.....	9
Tableau 2 : Classification botanique du thym.....	20
Tableau 3 : Localisation des principales espèces du thym en Algérie.....	21
Tableau 4 : Composition de l'huile essentielle de quelques espèces du thym.....	22
Tableau 5 : Influence du degré de pénétration sur l'activité.....	37
Tableau 6 : Principaux types d'infections fongiques rencontrées chez l'homme.....	43
Tableau 7 : Liste des souches microbiennes testées.....	50
Tableau 8 : Essais de préparation d'une pâte à base de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i>	55
Tableau 9 : Essais de préparation d'une pâte à base de thymol extrait.....	55
Tableau 10 : Evaluation de l'œdème.....	58
Tableau 11 : Erythème et formation d'escarres.....	58
Tableau 12 : Concentrations en huile essentielle (% v/v) obtenues avant et après mélange avec le milieu SDA.....	63
Tableau 13 : Composition relative de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	68
Tableau 14 : Comparaison des teneurs relatives de quelques composés de l'huile essentielle du genre <i>Thymus fontanesii</i>	71
Tableau 15 : Indices physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>thymus fontanesii</i>	72
Tableau 16 : Caractères organoleptiques et les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	76
Tableau 17 : Composition relative de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> extraite par entraînement à la vapeur d'eau.....	76
Tableau 18 : Comparaison des teneurs relatives des composés majoritaires de l'huile essentielle du <i>Thymus fontanesii</i> avec d'autres variétés du thym en Algérie.....	78
Tableau 19 : Teneurs relatives des constituants majoritaires de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> en fonction du temps.....	79
Tableau 20 : Composition chimique de l'huile essentielle de thym obtenue par hydrodistillation et par entraînement à la vapeur d'eau.....	85
Tableau 21 : Comparaison des caractéristiques de l'huile essentielle de thym extraite par hydrodistillation et par entraînement à la vapeur d'eau.....	88
Tableau 22 : Caractéristiques du thymol.....	89

Tableau 23: Essais de préparation de la pâte à base de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i>	90
Tableau 24: Essais de préparation de la pâte à base de thymol extrait.....	91
Tableau 25 : Evaluation de l'indice d'irritation cutanée primaire chez les lapins traites par la pate a base d'huile essentielle de thym.....	94
Tableau 26: Evaluation des réactions cutanées.....	94
Tableau 27: Evaluation de l'indice d'irritation cutanée primaire chez les lapins traites par la pate a base de thymol extrait.....	95
Tableau 28: Evaluation des réactions cutanées.....	96
Tableau 29 : Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition et le % d'inhibition de l'HE pure, de thymol extrait, des pâtes formulées et des pommades commercialisées (mycotine et mycocide) vis-à-vis des cinq bactéries et deux levures.....	98
Tableau 30: Valeurs des diamètres de la zone d'inhibition et le % d'inhibition de l'HE pure, de la pâte formulée et de la pommade de terbinafine.....	103
Tableau 31: Aromatogramme de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	105
Tableau 32: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales fongicides (CMF) d'HE de <i>Thymus fontanesii</i> relatives aux bactéries.....	106
Tableau 33: Concentration minimales inhibitrices (CMI) et concentration minimale fongicides (CMF) d'HE de <i>Thymus fontanesii</i> relatives aux levures.....	106
Tableau 34: Rapport CMB/CMI, CMF/CMI de différentes souches utilisées vis-à-vis d'HE de <i>T. fontanesii</i>	107
Tableau 35: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales fongicides (CMF) d'HE de <i>Thymus fontanesii</i> vis-à-vis des deux dermatophytes testées.....	108
Tableau 36: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) trouvé dans la littérature.....	110

Liste des figures

Fig. 1: Structure de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles.....	8
Fig.2 : Exemples de structures de quelques composés issus de la dégradation d'acides gras ou de terpènes d'origines diverses.....	8
Fig. 3: Molécule d'isoprène.....	11
Fig.4: Formation de l'isoprène actif (IPP) de l'acide mevalonique et isomérisation en DMAPP.....	12
Fig.5 : Mode d'élongation des processus terpéniques à partir du chaînon élémentaire, le diphosphate d'isopentenyle (IPP).....	13
Fig. 6: Schéma d'un appareil de couplage GC/MS.....	17
Fig. 7: Thym.....	19
Fig. 8 : Formule structurale du thymol.....	23
Fig.9 : Mécanisme réactionnel d'ionisation-cyclisation du diphosphate de geranyle via le diphosphate de linalyle.....	24
Fig.10 : Voies de biosynthèse des monoterpènes cycliques, dont le thymol à partir de différents cations terpenyles.....	25
Fig.11: Structure de la peau.....	34
Fig.12 : Schéma de l'organisation histologique de l'épiderme d'après Franceschini.....	35
Fig.13 : Schéma du processus de maturation des kératinocytes d'après Lavker et Maltosky.....	35
Fig.14: Voies principales de pénétration.....	38
Fig.15: Différentes classes de microorganismes.....	40
Fig.16: Infection superficielle à dermatophyte.....	44
Fig.17 : Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques (d'après Sheehan et coll., 1999).....	46
Fig.18 : Structures chimiques des principaux agents antifongiques.....	47
Fig.19: <i>Thymus fontanesii</i>	49
Fig.20: Système de distillation par hydrodistillation en laboratoire.....	51
Fig.21: Système de distillation par Entraînement à la vapeur d'eau.....	52

Fig.22: Technique de scorification, rasage et bandage des lapins.....	57
Fig.23 : Cinétique d'hydrodistillation de l'huile essentielle du <i>Thymus fontanesii</i> a différentes périodes de récolte.....	65
Fig.24 : Variation des teneurs relatives de l'huile essentielle en fonction de la date de cueillette du <i>Thymus fontanesii</i>	66
Fig.25 : Evolution de la vitesse d'extraction en fonction de la duree d'extraction de l'HE du thym.....	67
Fig.26 : Evolution temporelle de la proportion des composes majoritaires de l'huile essentielle en fonction de la date de cueillette du <i>Thymus fontanesii</i>	70
Fig.27 : Variation des teneurs relatives des principales classes chimiques de l'huile essentielle en fonction de la date de cueillette de <i>Thymus fontanesii</i>	70
Fig.28 : Biosynthèse thymol à partir γ -terpinène	75
Fig.29: Evolution du rendement de l'huile essentielle du <i>Thymus fontanesii</i> extraite par entrainement a la vapeur en fonction du temps.....	75
Fig.30: Composition relative de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> extraite par entrainement a la vapeur d'eau.....	77
Fig. 31: Evolution temporelle de la teneur des composes majoritaires de l'huile essentielle du <i>Thymus fontanesii</i>	82
Fig.32 : Variation des teneurs relatives des principales classes chimiques de l'huile essentielle au cours de l'entrainement a la vapeur du thym.....	82
Fig.33 : Variation du rendement d'huile essentielle du <i>Thymus fontanesii</i> en fonction de la technique d'extraction.....	83
Fig.34 : Variation des teneurs relatives des principales classes chimiques de l'huile essentielle en fonction de la technique d'extraction.....	86
Fig.35 : Evolution temporelle de la teneur des composes phénoliques de l'huile essentielle du <i>Thymus fontanesii</i> en fonction de la technique d'extraction.....	87
Fig.36: Thymol extrait par cristallisation sous l'action du froid.....	88
Fig. 37: Thymol extrait par la méthode liquide-liquide.....	89
Fig.38: Pate formulée a base d'HE de <i>T.fontanesii</i>	91
Fig. 39: Pate formulée a base de thymol.....	91
Fig.40: Résultats obtenus après 24h et 72h d'application des deux pates formulées.....	93

Fig.41: Activité antibactérienne et antifongique de l'HE de <i>T.fontanesii</i> sur: A. <i>S. aureus</i> , B. <i>Ps. Aeruginosa</i> , C. <i>C. albicans</i> , D. <i>Sa. Cereviceae</i>	101
Fig.42: Activité antibactérienne et antifongique de thymol extrait sur: A. <i>S. aureus</i> , B. <i>Ps. Aeruginosa</i> , C. <i>C. albicans</i> , D. <i>Sa. cereviceae</i>	101
Fig. 43: Activité antibactérienne et antifongique de la pâte à base d'HE sur: A. <i>S. aureus</i> , B. <i>Ps. aeruginosa</i> , C. <i>C. albicans</i> , D. <i>Sa. cereviceae</i>	102
Fig.44: Activité antibactérienne et antifongique de la pâte à base de thymol sur: A. <i>S. aureus</i> , B. <i>Ps. Aeruginosa</i> , C. <i>C. albicans</i> , D. <i>Sa. cereviceae</i>	102
Fig.45: Activité antifongique de la mycotine sur: A. <i>C. albicans</i> , B. <i>Sa. Cereviceae</i> et l'activité antibactérienne de la mycocide sur <i>S. aureus</i> (C)	102
Fig.46: Activité antifongique de: B. HE de <i>Thymus fontanesii</i> , C. pâte à base HE de <i>Thymus fontanesii</i> , D. pommade à base deTerbinafine (mg) sur T.mentagrophyte (A. témoin).....	104
Fig.47: Activité antifongique de: B. HE de <i>Thymus fontanesii</i> , C. pâte à base HE de <i>Thymus fontanesii</i> , D. pommade à base deTerbinafine	105
Fig.48 : CMI de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i> sur <i>T. mentagrophyte</i> par la méthode de disque et CMF par la méthode de dilution liquide.....	109
Fig.49 : CMI de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i> sur <i>M. canis</i> par la méthode de disque et de micropuit et CMF par la méthode de dilution liquide.....	109

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

Å Angström

AFNOR : Association Française de normalization

ATCC : American Type Culture Collection

°C: degré Celcius

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CFS : Concentration Fongistatique

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : concentration minimale bactéricide

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CRD : Centre de recherche et de développement - **SAIDAL**

DL50 : Dose létale 50

DMAPP: Diméthylallyl pyrophosphate

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : densité optique

DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle

EVE : entraînement à la vapeur d'eau

Fig: figure

F: fraction

µg : Microgramme

GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

GPP: Diphosphate de géranyle

H : Taux d'humidité.

HD : Hydrodistillation

HE : Huile essentielle

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

Hr : Humidité relative ou résiduelle

IC50 : Concentration inhibitrice de 50 % (*Inhibitory Concentration of 50 %*)

IE Indice d'ester

IPP: Diphosphate d'isopentényle

IR Indice de réfraction

IR : Infra-Rouge

IRTF: Spectrométrie Infra-Rouge par Transformée de Fourier

J : jours

Kg : Kilogramme

µl: microlitre

LPP: Diphosphate de linalyle

µm :micromètre

m/z : rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires d'ions (*MS*)

M-H : Mueller Hinton

µmol :micromole

MS : spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*)

M_H : Masse humide de la matière végétale

M_s: Quantité de la matière végétale sèche
M₀ : Masse de l'échantillon avant étuvage
M₁ : Masse de l'échantillon après étuvage
M_{HE}: Quantité d'extrait récupérée
nm : nanomètre
OMS : Organisation Mondiale de le Santé
P : pression
Patm : pression atmosphérique
P.F. : Point de fusion
pH : Potentiel d'Hydrogène
ppm : partie par million
R : Rendement en extraits
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SAB : sabouraud
SAC : sabouraud actidione chlorophénécole
SDA : sabouraud dextrose agar
SM : Spectrométrie de Masse
SDA : *Sabouraud Dextrose Agar*
Téb : Température d'ébullition
tr : Temps de rétention
UI : unité internationale
UFC : Unité Formant des Colonies
UV : Ultra-Violet
Vf : Volume finale
Vi : Volume initiale
% : Pourcentage

Introduction

INTRODUCTION GENERALE

Les infections microbiennes restent des affections graves et leur fréquence a augmenté de façon considérable au cours des dernières années en raison principalement du nombre accru de patients immunodéprimés et d'interventions médicochirurgicales invasives [1]. D'un autre côté, l'usage extensif des agents antibactériens et antifongiques chimiques dans la médication humaine ainsi que dans les élevages animaux conduit à la sélection de souches microbiennes résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments. Ainsi, les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêts comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet de multiples études pour leur éventuelle utilisation comme alternative dans le traitement des maladies infectieuses. Le traitement des mycoses cutanées bénéficie actuellement de nombreux antifongiques actifs et efficaces. Malgré cela, le problème des résistances de plus en plus nombreuses à un ou plusieurs antifongiques persiste encore. Par ailleurs, le problème des récurrences n'est pas résolu et on sait qu'il n'y a pas d'immunité vis-à-vis des champignons, mais plutôt d'un terrain favorable aux mycoses. Ce problème de mycoses à répétitions a été soulevé et il semblerait s'agir beaucoup plus d'une absence d'éradication du germe que d'une infestation [2].

Ces différentes difficultés ont suscité notre intérêt pour la recherche d'autres substances antifongiques et/ou antibactériennes pouvant constituer une solution alternative aux médicaments actuels. Différentes espèces végétales sont connues depuis longtemps pour leurs effets antimicrobiens. Les plantes aromatiques et médicinales constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés médicales des plantes médicinales dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques. Ces propriétés, dues souvent à la fraction huile essentielle (HE), peuvent être mises à profit pour traiter les infections mycosiques. L'usage des huiles essentielles en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables [2].

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Leurs propriétés, dues notamment à la fraction huile essentielle, peuvent être mises à profit pour traiter les infections mycosiques. A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, on s'est intéressé aux espèces de la famille des Lamiacées qui est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien. La plante sur laquelle a porté notre choix est une espèce de thym (*Thymus fontanesii*) provenant de la région de LAKHDARIA; bien que relativement abondante et largement utilisée, cette espèce a été peu étudiée.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antimicrobienne de deux produits pharmaceutiques l'un à base de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et l'autre à base de son thymol extrait. Cette activité a été évaluée sur des bactéries, des levures et des dermatophytes responsables de mycoses humaines.

Notre étude sera donc répartie en cinq chapitres, initiés par une recherche bibliographique où nous apportons dans le premier chapitre une généralité sur les plantes médicinales et les huiles essentielles, leurs compositions, leurs biosynthèses, leurs activités biologiques et pharmacologiques ainsi que sur les méthodes d'extraction et d'identification des HES et de ces composés, plus particulièrement celles du thym et du thymol. Nous effectuerons également une présentation botanique de la famille Lamiacées et l'espèce thymus, sa localisation géographique dans le monde et dans notre pays, son utilisation et les travaux antérieurs dont elle a fait l'objet.

Le second chapitre sera consacré à l'étude anatomique de la peau humaine, ainsi nous décrirons les différentes formes médicamenteuses destinées à la voie cutanée. Une généralité sur les microorganismes pathogènes et les principaux moyens de lutte contre eux sont rapportés dans le troisième chapitre.

La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, le premier (chapitre quatre) présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir:

- l'extraction et l'identification d'HES de *Thymus fontanesii* et de thymol extrait;
- test de la tolérance locale de nos pâtes;
- test de sensibilité des bactéries, des levures et des dermatophytes vis-à-vis de nos produits utilisés.

Le second (le cinquième chapitre) abordera les différents résultats et leurs discussions.

Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

CHAPITRE I

Généralités sur les plantes médicinales et les huiles essentielles

Généralités sur les plantes médicinales et les huiles essentielles

GENERALITES SUR LES PLANTES MEDICINALES ET LES HUILES ESSENTIELLES

I.1 Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme, puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois dans ses rites religieux.

L'utilisation des plantes médicinales comme source de remède pour se soigner ou prévenir des maladies est originaire des millénaires jusqu'à la récente civilisation chinoise, indienne et du proche-orient. Elle est devenue certainement un art. Au fil des siècles, la thérapeutique par les plantes s'est dissociée des pratiques magiques pour devenir empirique puis scientifique. Cela était évident au début du 19ème siècle qui marque la découverte des alcaloïdes (la morphine, la strychnine, quinine...). Dans les pays industrialisés, les recherches dans le domaine des plantes médicinales durant les dernières décennies. Néanmoins, les substances actives isolées constituent environ 25% des préparations médicamenteuses [3].

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore Paléo Tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques. Ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable. Les objectifs fixés sont l'inventaire ainsi que l'évaluation chimique et pharmaceutique des plantes médicinales algériennes dans le double but de valoriser et de rationaliser leur usage traditionnel et d'isoler des composés d'intérêt thérapeutique potentiel [3].

Les plantes médicinales sont toutes les plantes qui auraient une activité pharmacologique pouvant conduire à des emplois thérapeutiques. Cela grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain. Elles sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire, en cosmétologie, ainsi que dans la confection de boissons, soit nature, soit en préparation galéniques, soit encore sous forme de principes actifs, comme matière pour l'obtention de médicaments [4,5].

I.2 Activité antimicrobienne de plantes aromatiques et médicinales

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aurait fallu attendre le début du 20^{ième} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser [6]. De nombreuses études ont prouvé les activités antimicrobiennes de diverses plantes [7,8,9]. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction d'huile essentielle contenue dans les plantes [10]. En effet, un grand nombre de ces plantes possède des propriétés médicinales: antibactériennes, antifongiques, anti-tumorales, anti-drépanocytaires, anti-inflammatoires ou analgésiques [10,11].

Les effets antimicrobiens de différentes espèces d'herbes et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ceci a été confirmé par un certain nombre de travaux [12,13,14,15].

I.3 Huiles essentielles

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne des hommes qui les utilisaient autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner.

Beaucoup de travaux sont réalisés dans ce sens, du fait de l'importance incontestable des huiles essentielles dans divers secteurs économiques, comme par exemple, l'industrie de la parfumerie et de la cosmétique, l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique et plus particulièrement, la branche de l'aromathérapie qui utilise leurs propriétés bactéricides et fongicides [16].

Cependant, l'organisme de normalisation **AFNOR (2000)** [17] (Association Française de Normalisation) a donné une définition qui prend en compte le mode d'obtention des huiles essentielles: est « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation à sec. Cette définition est cependant restrictive car elle exclut aussi bien les produits extraits à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé.

Nous retenons alors que les huiles essentielles sont des mélanges de complexes aromatiques de plantes, extraits par distillation à la vapeur d'eau ou aux solvants [8,18].

I.3.1 Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les HE n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface des tissus de plantes et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites 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 être stockées dans divers organes végétaux : les fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rose, ...), les sommités fleuries (tagète, lavande, ...), les feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier, ...), les racines (vétiver), les rhizomes (gingembre, curcuma, ...), les fruits (ainsi, badiane, ...), le bois (bois de rose, santal, ...) ou les graines (ambrette, muscade, ...)[15,19,20].

Elles diffèrent par leur taille, leur paroi ou leur contenu, caractérisant parfois une famille donnée. Elles jouent un rôle important dans la détermination des conditions d'extraction des produits volatils qu'elles contiennent ...) [19]. Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe [15].

I.3.2 Fonction biologique des HE

Parmi les composants majoritaires des huiles essentielles, nous trouvons les terpénoïdes qui possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allélopathiques, c'est-à-dire inhibiteur de la germination, mais aussi lors des interactions végétal-animal, comme agent de protection contre les prédateurs tels que les insectes. Ils interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateurs [21,22].

I.3.3 Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces composés sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes [16]. Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, y sont rencontrés soit, les monoterpènes (myrcène, α -pinène, γ -terpinène, sabinène, etc.) et les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène, etc.) (Fig.1).

Rappelons ici que les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités "isopréniques" (C_5H_8), soit deux unités pour les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) et trois unités pour les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$). Ils ont la même origine métabolique. Ces composants majeurs déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles [23,24,25].

Exceptionnellement, quelques diterpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles [16,18,26]. La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono- et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol, α -bisabolol), des cétones (menthone, β -vétivone), des aldéhydes (citronellal, sinensal), des esters (acétate d' α -terpinyle, acétate de cédryle), des phénols (thymol), etc. (Fig.1). Plus de 22.000 composés isopréniques ont été répertoriés, mais seul un petit pourcentage d'entre eux a été étudié dans la perspective d'évaluer leurs rôles fonctionnels [27].

Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, qui empruntent une voie biosynthétique différente de celle des terpènes [16] (fig. 1). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole, et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'Apiaceae (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, la vanille, la cannelle, le basilic, l'estragon, etc. [16,19].

Les dérivés phénylpropanoïques et les terpénoïdes sont associés en nombre et en proportions très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs où ils forment l'essence naturelle [16].

Enfin, il existe un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation, de terpènes non volatils (c'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petites odorantes, comme par exemple le (3Z)-hexén-1-ol ou le décanal, qui sont obtenues à partir des acides linoléique et α -linoléique) (Fig. 2) [19].

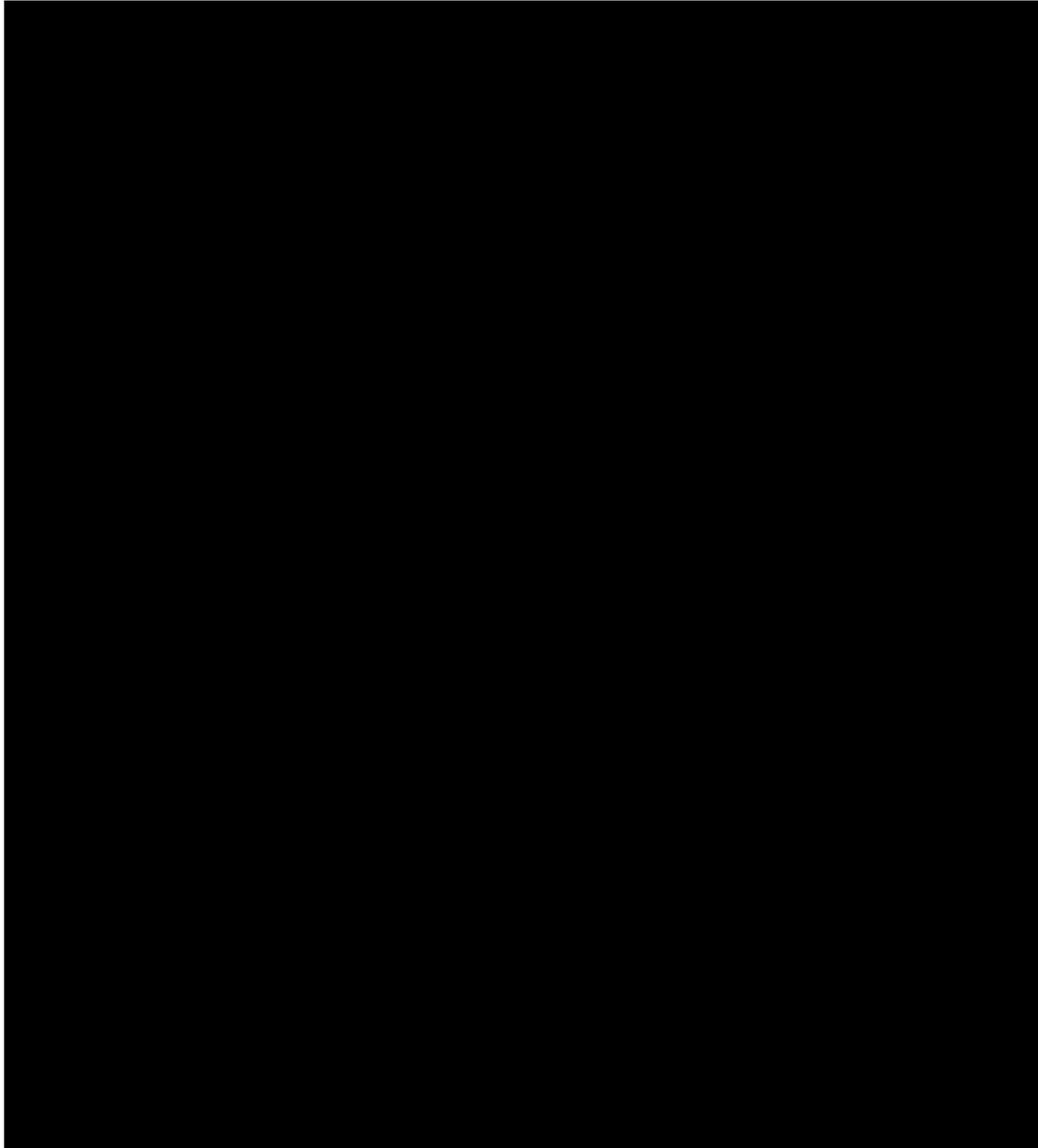


Fig. 1: Structure de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles [16].

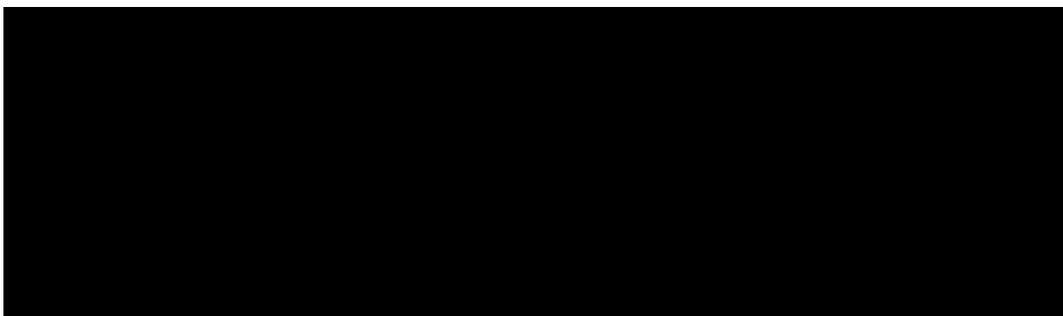


Fig.2 : Exemples de structures de quelques composés issus de la dégradation d'acides gras ou de terpènes d'origines diverses [19].

Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans le **tableau 1**.

Tableau1 : Activités biologiques de certains composés terpéniques

Familles	Exemples	Propriétés	Référence
Hydrocarbure aliphatique Monoterpènes	Limonene (carvi, pin),	Fongistatique Bacterostatique Insecticide Nematicide	[18]
	α et β -pinène (sapin)	Antimutagenique Herbicide Stimulation générale	[28]
Sesquiterpènes	Bisabolème, alpha-humulème, bita-caryophyllène (pin)	Calmants Anti-inflammatoire Anti-allergique Antibactériens et antifongique	[7]
Phénols	Thymol (thym),	Antioxydant Stimulantes Toniques	[34] [29]
	carvacrol (origan),	Antiseptiques Bactéricides	[30] [31]
	eugénol (clou de girofle)	Fongicides Anti-virale Antiparasitaires Irritantes	[32] [33]
	Linalol (bois de rose), geraniol (palmarosa), menthol (menthe poivrée), citrnellol (citronnelle)	Anti-inflammatoire Antiseptiques Bactéricides Fongicides Anti-virale Anti-allergique Immunostimulants Neurotoniques	[35] [28] [7]
	Bisabolol (matricaire), viridiflorol (niaouli), cadrol (cyprés)	Toniques et stimulants généraux Décongestionnants veineux et lymphatiques	[7]
Aldehydes terpénique	Citral (mélisse citronnée), citronellal (citronnelle, eucalyptus citronne) géraniale (verveine citronnée)	Antifongique Sporicidas Insecticide Antihypertensifs Anti-inflammatoire	[7]
Cétones	Carvone (carvi), menthone (menthe poivrée), camphre (romarin), thuyone (sauge)	Calmantes Antivirales Antifongiques Neurotoxiques Anti-épileptiques Dépresseurs à dose élevées	[18]

I.3.4 Paramètres influençant la composition quantitative et qualitative des plantes aromatiques

Une huile essentielle est très fluctuante par rapport à sa composition chimique sur laquelle interviennent un certain nombre de paramètres, les principaux facteurs de variabilité de cette composition sont d'origine intrinsèque et extrinsèque : le génotype, l'environnement, l'origine géographique, la période de récolte, la température et la durée de séchage ainsi que le mode d'extraction [15,36].

Le premier paramètre influençant la composition chimique d'une plante est sa biosynthèse et donc son profil génétique. C'est la raison pour laquelle, une même espèce peut présenter plusieurs chémotypes de profils chimiques différents. Il existe de nombreux exemples d'un tel phénomène, notamment chez le thym, la sauge... [21,36].

Un chémotype est une race chimique. En fait, une même espèce végétale peut fournir des huiles essentielles de compositions chimiques différentes. Ces différences sont dues à la période de récolte des plantes, au mode d'extraction utilisé, aux facteurs environnementaux (altitude, ensoleillement, nature du sol, ...) [36,37,38]. L'exemple le plus marquant est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris* présente dans le sud de la France. Il existe en effet six chémotypes différents pour cette même et seule espèce. Ces différences sont au niveau de la nature du monoterpène majoritaire de l'huile essentielle qui peut être soit le géraniol, le linalool, l' γ -terpinéol, le thujanol-4-terpinéol-4, le thymol ou le carvacrol [21]. Ce polymorphisme chimique existe aussi pour bien d'autres espèces: *Origanum glandulosum* [23], *salvia officinalis* [36] en sont des exemples. Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables. [39].

Les conditions environnementales influencent aussi la composition. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la pluviométrie et les conditions édaphiques (composition du sol) représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée [36,37,38].

Pour la même espèce, le même génotype et le même stade de développement, les facteurs extrinsèques peuvent engendrer des modifications quantitatives et qualitatives importantes pour les huiles essentielles. Ceci a été confirmé par un certain nombre de travaux [16,40].

Ils ont remarqué que les facteurs extrinsèques les plus importants qui influencent la production des huiles essentielles sont le climat (température et lumière) et le sol (eau et

fertilisants). Chez la *Mentha piperita* par exemple, les nuits froides favorisent la formation de menthol alors que les nuits tempérées favorisent celle du menthofuranne [19].

Les études portant sur la variation de la composition chimique des huiles essentielles en fonction du cycle circadien et des saisons sont nombreuses [20]. L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment de l'année sont en effet des facteurs importants [18]. A titre d'exemple, **Badi et al.(2004) [41]** ont montré que la formation des principes actifs se fait spécialement pendant la période de pleine croissance et durant les temps de métabolismes intensifs comme les périodes de floraison et de fructification. Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en huile essentielle. Les Citrus par exemple ont une teneur plus importante en huile essentielle lorsque la température est élevée [19].

I.4 Biosynthèse des composés terpéniques

I.4.1 Définition [42].

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 (**Fig.3**).

Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.)



Fig.3: Molécule d'isoprène [42].

I.4.2 Classification

Dans le règne végétal, les terpénoïde sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires (avec les flavonoïdes et les alcaloïdes). Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène: hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes (C40) et polyterpènes [27] (**figure 5**).

I.4.3 Biosynthèse des tetrpénoïdes dans le règne végétal

La biosynthèse des terpènes (**Fig.5**) suit la voie de l'acide mévalonique (MVA). Ce dernier subit une phosphorylation ensuite une décarboxylation et une déshydrogénation et on obtient alors de l'isopentenylpyrophosphate (IPP) ou isoprène actif. C'est le IPP qui constitue l'unité isoprénique d'enchaînement, et il s'isomérisé en diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) grâce à une enzyme, l'IPP isomérase [**42,43**] (**Fig. 4**).

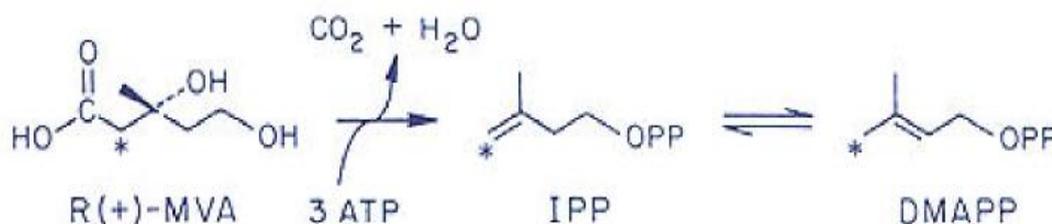
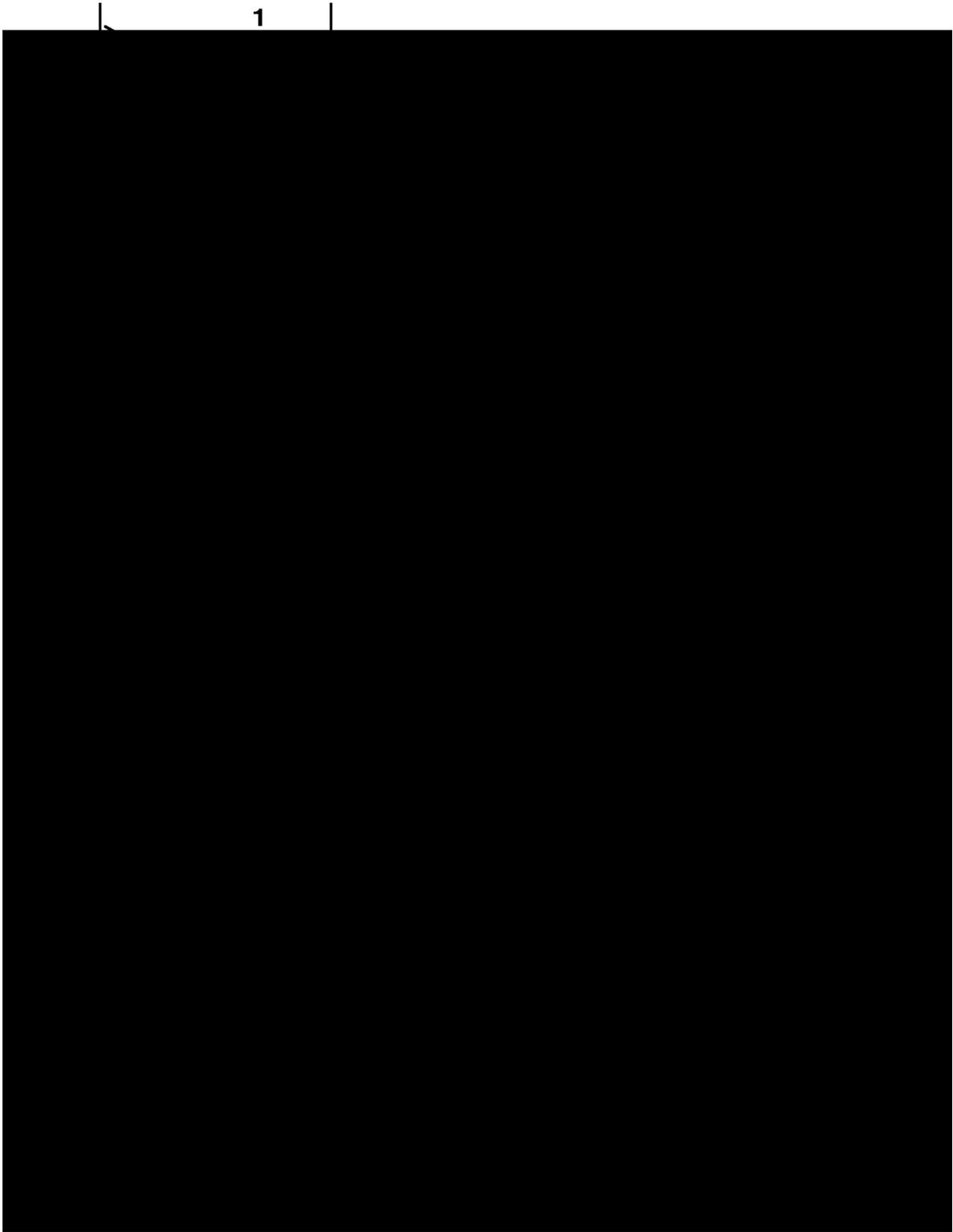


Fig.4: Formation de l'isoprène actif (IPP) de l'acide mévalonique et isomérisation en DMAPP [42]

La condensation du diphosphate d'isopentényle (**IPP**) (entité nucléophile) sur le diphosphate de diméthylallyle (**DMAPP**) (entité électrophile) mène au diphosphate de géranyle (**GPP, C₁₀**), précurseur des monoterpènes [**42,43**] (**figure 3**). Une condensation supplémentaire de type tête-à-queue de l'IPP sur le GPP conduit au diphosphate de farnésyle (**FPP, C₁₅**), précurseur des sesquiterpènes. Une élongation supplémentaire du diphosphate de farnésyle avec une entité d'IPP, conduit au diphosphate de géranylgeranyle (**GGPP**), précurseur des diterpènes et des caroténoïdes. Tandis qu'une condensation "tête-à-tête" de deux molécules de diphosphate de farnésyle aboutit au squalène (**C₃₀**), précurseur des triterpènes, des stérols [**42,43**] (**Fig. 5**). Ces précurseurs acycliques isopréniques peuvent subir différentes réactions chimiques (oxydations, cyclisations suivies de transpositions), ce qui permet de dénombrer à ce jour plus de 22 000 isoprénoïdes [**27**].



- 1 : isopentényl diphosphate isomérase
- 2 : géranyl diphosphate synthétase
- 3 : farnésyl diphosphate synthétase
- 4 : géranylgéranyl diphosphate synthétase

Fig.5 : Mode d'élongation des processus terpéniques à partir du chaînon élémentaire, le diphosphate d'isopentényle (IPP) [44].

I.5 Procédés d'extraction des huiles essentielles

Le procédé d'obtention d'une essence végétale intervient de façon déterminante dans la nature des produits d'extraction. Plusieurs procédés d'extraction des principes végétaux sont connus et utilisés à ce jour, dont l'expression à froid, l'extraction par solvant organique volatil [19], l'extraction à l'eau surchauffée [19], l'extraction au CO₂ supercritique [19], par micro ondes [45], par ultrasons [19], par l'entraînement à la vapeur d'eau et par l'hydrodistillation [19]. De tous ces procédés, ces deux derniers sont les plus employés à l'échelle industrielle pour la production d'huiles essentielles [46]. L'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation sont les deux procédés utilisés pour l'extraction des huiles essentielles auxquelles nous nous intéressons.

I.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 [39]. Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau [47].

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 [19]. Cette technique a été appliquée dans de nombreux travaux [23,36,48].

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 [39]. Cette méthode est industriellement la plus utilisée pour l'extraction d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* dans le but d'obtenir un bon rendement de l'essence et de réduire le temps d'extraction [49].

I.5.2 Extractions des produits actifs

L'extraction est un procédé chimique qui permet de séparer un composé d'un mélange ou d'une solution. Le meilleur solvant à utiliser est celui dans lequel le composé à extraire est très soluble. Une succession d'opérations peut être nécessaire avant que le composé ne puisse être isolé par distillation ou par évaporation du solvant.

Une autre méthode consiste à effectuer une réaction chimique entre le composé à extraire et un réactif dont le produit est facilement séparable du reste de la solution. Dans ce cas, il faut disposer d'un réactif hautement sélectif. En effet, ce dernier ne doit pas réagir avec d'autres composés présents dans la solution. Les réactions mises en jeu sont essentiellement des réactions de complexation, des réactions d'oxydoréduction ou des réactions acidobasiques. Il s'agit de choisir judicieusement la réaction adéquate, de manière que le produit ne soit plus soluble dans le solvant considéré. Il se forme alors un précipité que l'on récupère par filtration. Le composé recherché est restitué par la réaction inverse de celle qui a servi à former le précipité [50].

I.6 Méthode d'analyse de la composition chimique des huiles essentielles.

Les huiles essentielles présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que la pharmacie, la cosmétique, la parfumerie et l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur d'activité, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les progrès constants des différentes techniques de séparation et d'identification, demeure toujours une opération délicate nécessitant la mise en oeuvre simultanée ou successive de diverses techniques [51].

I.6.1 Méthodes d'analyses physiques et chimiques

Ces méthodes permettent d'obtenir les caractéristiques physiques et chimiques propres à chaque huile essentielle, et peuvent servir de critères de qualité entre producteurs et acheteurs. La densité, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, le point de congélation, les indices d'acide, d'ester et de carbonyle, la solubilité dans l'éthanol, ...etc., constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. Ces essais sont déterminés selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'Organisation de Normalisation (I.S.O) [36].

I.6.2 Méthodes de détermination des constituants de l'huile essentielle

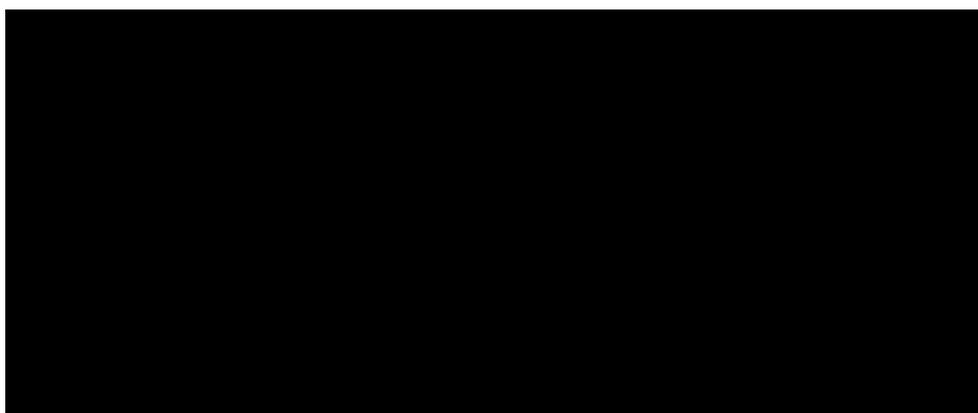
L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en oeuvre de plusieurs techniques [51]. La première approche, qui est la plus couramment employée, est l'utilisation du couplage d'une technique chromatographique, généralement la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) permettant l'individualisation des constituants, avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM) et/ou la spectrométrie Infra-Rouge par Transformée de Fourier (IRTF), permettant l'identification des constituants par comparaison des données spectrales avec celles de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Les données spectrales sont systématiquement associées à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane. Pour faciliter l'identification des composés minoritaires les huiles essentielles peuvent être soumises à un fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) ont été utilisées par plusieurs auteurs [18,38,52,53].

Le couplage CPG/SM est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles (**Fig.6**). Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation. Dans la source d'ionisation les molécules sont bombardées à l'aide d'électrons, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, est ensuite détecté et transformé en un signal utilisable. Pour ce faire, il existe différents types de détecteurs capables de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Toutefois, les détecteurs les plus courants

sont les multiplicateurs d'électrons ou de photons, permettant l'augmentation de l'intensité du signal détecté.

Finalement, l'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit en valeurs de masses et d'intensités des pics et en courant ionique total. Il permet l'examen des données enregistrées et leur manipulation : spectres de masse, chromatogrammes reconstitués, soustraction d'un spectre par rapport à un autre, calcul d'une moyenne sur plusieurs spectres, etc... Les spectres de masse ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Wiley Registry of Mass Spectral Data, contenant plusieurs milliers de spectres, König-Joulain, intitulée « Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils » contenant plus de 1200 composés) [51].

Pompe primaire



**Pompe
secondaire**

Chromatographe en phase gazeuse Spectromètre de masse

Fig. 6: Schéma d'un appareil de couplage GC-MS [54]

I.7 Présentation de la famille des *Lamiacées*

La région méditerranéenne d'une manière générale et l'Algérie en particulier, avec son climat doux et ensoleillé est particulièrement favorable à la culture des plantes aromatiques et médicinales. La production des huiles essentielles à partir de ces plantes pourrait constituer à ce titre une source économique importante pour notre pays. Cette étude porte sur la famille des *Lamiacées*.

La famille des *Lamiacées* est l'une des plus répandues dans le règne végétal [4]. C'est une famille d'une grande importance aussi bien pour son utilisation en industrie

alimentaire et en parfumerie qu'en thérapeutique. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant [28,55,56]. Il est bien connu que les huiles essentielles extraites des plantes de cette famille possèdent des propriétés pharmacologiques tant sur le plan humain qu'industriel. De nombreuses propriétés leurs sont conférées: anti-infectieuses, antispasmodiques, antalgiques, toniques, digestives, cicatrisantes... Les huiles essentielles par la diversité des constituants qui les composent, sont des substances très actives [16,56].

Cette famille comprend près de **6700** espèces regroupées dans environ **250** genres [57]. La région méditerranéenne a été le centre principal pour domestication et culture de Labiatae [4]. *Lamiaceae*, caractérisée par des plantes productrices d'huiles essentielles [4]. Les genres les plus cités dans la littérature sont : *Salvia officinalis* [36], *Mentha spicata* [58], *Origanum vulgare* [13], *Rosmarinus officinalis* [12,49], *Ocimum basilicum* [29]. Ainsi que de nombreuses espèces du genre *Thymus* qui ont été abondamment étudiées de ce point de vue [25,35,59,60]. Un très grand nombre de genres de la famille des *Lamiaceae* sont des sources riches en terpénoïdes, flavanoïdes et iridiodes glycosylés et composés phénoliques [4]. Le genre *Thymus* représentant l'objectif de notre recherche regroupe plus de 250 espèces [57] largement distribuées dans l'aire méditerranéenne et utilisées comme antibactériens et anti-inflammatoires dans la pharmacopée traditionnelle de la région [55,60].

I.8 Thym

I.8.1 Historique

Le terme « **thym** » est apparu dans la langue française au XIII^e siècle, d'abord sous la forme de « tym ». Selon certaines sources, il est dérivé du latin *thymus*, qui l'a emprunté du grec *thumos*, signifiant, de façon quelque peu obscure, « grosseur ou loupe » (par référence à la glande, le thymus). D'autres pensent plutôt que le mot vient du grec *thymos* ou *thyein*, qui signifie « fumée », par allusion au fait qu'il était jadis brûlé comme encens et qu'on lui attribuait alors le pouvoir d'éloigner les créatures venimeuses. D'autres, enfin, font dériver le mot du grec *thumus*, qui signifie « courage », la plante étant jadis considérée comme revigorante.

Il semblerait que, pendant longtemps, le thym ait surtout été employé en médecine et dans les rituels religieux ou magiques, ses usages culinaires se limitent à aromatiser le fromage et les liqueurs. Les Égyptiens s'en servaient pour embaumer leurs morts, les Grecs

pour parfumer les temples et l'eau des bains, les Romains pour purifier leurs appartements. Les Romains ont probablement diffusé le thym en Europe durant leurs invasions, particulièrement dans les pays du Sud. Au Moyen Âge, on s'en est beaucoup servi pour masquer les mauvaises odeurs, notamment celles de la viande ou du poisson avarié [61]. De nos jours, le thym est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne. Ses feuilles sont riches en huiles essentielles dont les propriétés sont mises à profit en phytothérapie et en médecine, comme produit vétérinaire (antiparasites, antispasmodique, antiseptique et digestif). Cela a été mentionné dans plusieurs études [60,62,63]. Il est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, en décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et gastrites, en usage externe comme cicatrisants. Il possède des vertus antiseptiques utilisées pour soigner les infections pulmonaires, calmer les toux quinteuses, diminuer les sécrétions nasales et soulager les problèmes intestinaux comme il l'a été rapporté par certains auteurs [62,64,65].

I.8.2 Caractéristiques botaniques

I.8.2.1 Description

Les thyms (*Thymus*) sont des plantes basses sous -ligneuses, pouvant atteindre 40 cm de hauteur. Ils possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur verte foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes. 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. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose [65].



Fig.7: Thym (*Thymus fontanesii*.L)

I.8.2.2 Classification

Tableau 2 : Classification botanique du thym

Règne	Plantae (végétal)
Embranchement	Spermaphytes (phanérogames)
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Métachlamydées (gamopétales)
Ordre	Tubiflorales
Sous ordre	Verbéninées
Famille	Labiacées (labiées)
Genre	Thymus

I.8.3 Répartition géographique

I.8.3.1 Dans le monde

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées [4]. Selon **Dob et al. (2006) [66]**, il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée. C'est une plante très répandue dans le nord ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye), elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya.

Selon une étude menée par **Nickavar et al., (2005) [67]**, environ **110** espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen. C'est pour cela que l'on peut considérer la région méditerranéenne comme étant le centre de ce genre.

I.8.3.2 En Algérie

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales en regard de sa superficie et sa diversité bioclimatique. Le thymus de la famille des Lamiacées ou Labiées, comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides [68]. Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leur variabilité et leur tendance à s'hybrider facilement. Sa répartition géographique est représentée dans le **tableau 3**

Tableau 3 : Localisation des principales espèces du thym en Algérie [68]

Espèces	Découverte par	Localisation	Nom local
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et Link	Rare dans le région de Tlemcen	Auteure
<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie-Tunisie	Auteure
<i>Thymus commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran	-
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans : Le sous sectoru de l'atlas tellien La grande et la petite Kabylie De Skikda à la frontière tunisienne, Tell constantinois	Tizaâtar
<i>Thymus guyonii</i>	Noé	Rare dans le sous secteur des Hauts Plateaux algérois, oranais et constantinois	-
<i>Thymus lancéolatus</i>	Desfontaine	Rare dans : Le secteur de l'atlas tellien (Terni de Médéa Benchicao) et dans le sous secteur des Hauts Plateaux algérois, oranais (Tiaret) et constantinois	Zaâteur
<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous secteur de l'Atlas Saharien et constantinois	Tizerdite
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral	Djertil Hamrya
<i>Thymus glandulosus</i>	Lag	Très rare dans le sous secteur des Hauts Plateaux algérois	-
<i>Thymus algériensis</i>	Boiss et Reuter	Très commun dans le sous secteur des Hauts Plateaux algérois et oranais	Djertil Zaitra
<i>Thymus munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord algérois	Djertil

I.8.4 Huile essentielle du thym

L'essence du thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives [62,41]. Les huiles essentielles du thym sont composées par des molécules aromatiques d'origine végétale présentant une très grande diversité de structure. La variabilité chimique des HEs du thym dépend de plusieurs facteurs, qui généralement sont d'ordres climatiques et environnementaux. Mais peuvent être aussi d'ordre génétique et saisonnier (stade végétale) [34]. Ainsi, une étude menée par **Dob et al. (2006)** [66] sur les thymus d'Afrique du nord a démontré que le composé majoritaire était le thymol chez les espèces d'Algérie et du Maroc et le carvacrol chez les espèces de Tunisie.

De nombreux travaux ont été réalisés sur l'huile essentielle du thym. Nous nous limiterons dans notre étude à quelques uns parmi les plus récents. Le **tableau 4** nous donne une étude comparative des principaux composés de l'huile essentielle des feuilles de quelques espèces du thymus.

Tableau 4 : Composition de l'huile essentielle de quelques espèces du thym

Espèce	Pays	Composition	Référence
<i>T. vulgaris</i>	Turquie	p-cymène 9.9%, thymol 46.2% linalool 4%, γ -terpnène 14.1%	[69]
<i>T. vulgaris</i>	Espagne	p-cymène 18.7%, thymol 57.7% carvacrol 2.8%, linalool 2.1%	[25]
<i>T. rosulans</i>	Turquie	Carvacrol 58.1%, p-cymène 4.1% thymol 20.5%, γ -terpnène 4.4%	[31]
<i>T. sipyleus</i>	Turquie	Borneol 11.2%, Muurolol 9.2% B-caryophyllen 7.6%, Geranial 7.3%	[31]
<i>T. zygis</i>	Espagne	Linalool 82.3%, p-cymène 0.5% thymol 2.1%, carvacrol 0.1%	[25]
<i>T. hyemalis</i>	Espagne	p-cymène 16.0%, thymol 43.0% carvacrol 2.4%, γ -terpnène 8.4%	[25]
<i>T. capitatus</i>	Sardinia (italy)	p-cymène 26.4%, thymol 29.3% carvacrol 10.8%, γ -terpnène 8.4%	[63]
<i>T. capitatus</i>	Tunisie	Carvacrol 62.83%, p-cymène 5.1% γ -terpnène 2.4%	[70]
<i>T. herba-barone</i>	Sardinia (Nord de Italy)	p-cymène 27.6%, thymol 50.3% carvacrol 2.9%, γ -terpnène 6.1% linalool 5.8%	[63]
<i>T. herba-barone</i>	Ardinia (centre Italy)	p-cymène 5.2%, thymol 46.9% carvacrol 20.6%, γ -terpnène 4.6% linalool 3.3%	[63]
<i>T. serpyllum</i> (befor floring)	Iran	p-cymène 21.12%, thymol 18.73% carvacrol 1.34%, γ -terpnène 21.90% linalool 1.08%	[71]

<i>T. serpyllum (al floring)</i>	Iran	p-cymène 2.85%, thymol 18.68% carvacrol 0.41%, γ -terpnène 22.69% linalool 1.44%	[71]
<i>T. pubescens (befor floring)</i>	Iran	p-cymène 2.85%, thymol 11.94% carvacrol 64.79%, γ -terpnène 6.12%	[71]
<i>T. pubescens (al floring)</i>	Iran	p-cymène 12.65%, thymol 13.88% carvacrol 48.75%, γ -terpnène trac borneol 3.77%	[71]
<i>T. satureioides</i>	Maroc	Borneol 26.40%, Thymol 11.48 % Carvacrol 8.76%	[55]
<i>T. eriocalyx</i>	Iran	Thymol 64.3%, β -phellandrene 13.2% cis-sabinenehydroxide 8.4%	[53]
<i>T.x-porlock</i>	Iran	Thymol 30.7%, β -phellandrene 39.4% cis-sabinenehydroxide 9.7%	[53]

La variation détectée dans la composition chimique de l'huile essentielle du thym issue de différents pays est liée à plusieurs paramètres tels que : le facteur environnemental, les conditions climatiques et géographiques variant d'un pays à un autre, et la période de la cueillette. La méthode d'extraction influe, aussi, considérablement sur la composition de l'huile essentielle [36,63]. Plusieurs espèces de thym possèdent de nombreuses activités biologiques tels que antispasmodique, antimicrobienne, antibactérienne, antiviral, antioxydant et activité fongicides, anti-inflammatoire, antiseptique, carminatif [62,64,65].

I.9 Thymol

Le thymol est l'un des principaux phénols reconnus dans l'huile essentielle de quelques Labiatae (lamiaceae) comme le thym, origan et sarriette, dont le contenu peut atteindre jusqu'à 84% [24]. Thymol a été découvert par *Caspar Neumann* en 1719. Il a été épuré, en 1853, par *M. Lallemand*, qui lui a donné le nom « thymol » et a attribué la formule (vieille notation) $C_{20}H_{14}O_2$, la même acceptée aujourd'hui et correspondant à $C_{10}H_{14}O$ de la nouvelle notation. Thymol est un phénol (**2-Isopropyl-5-methyl-phenol**) (fig. 8), et est isomérique avec le carvacrol (**2-Isopropyl-5-methyl-phenol**).

Le thymol existe dans l'huile de thym, lié à d'autres hydrocarbures d'une plus grande volatilité, p-cymène ($C_{10}H_{14}$), et thymene ($C_{10}H_{16}$) [72].

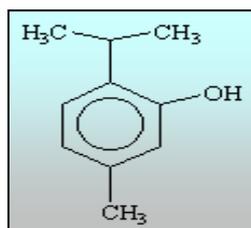


Fig. 8 : Formule structurale du thymol [33].

Plusieurs études ont montré que le thymol possède de nombreuses activités biologiques tels que antispasmodiques, antimicrobiennes, antibactériennes, activités fongicides, insecticides, antioxydant, anti-cancérogènes et anti-inflammatoires [73,74].

I.9.1 Biosynthèse du thymol

Actuellement, le diphosphate de géranyle (**GPP**) est considéré comme le précurseur physiologique universel des monoterpènes et son isomérisation s'impose avant la cyclisation. Cette dernière passe par l'intermédiaire de son isomère allylique tertiaire, le diphosphate de linalyle (**LPP**). Il a été récemment établi que le LPP se lie effectivement à l'enzyme pendant les processus de cyclisation. Les monoterpènes cycliques dérivent d'un même mécanisme réactionnel électrophile (**fig. 9**). Il s'agit d'un cation terpényle-8, véritable plaque tournante dans la biogénèse des monoterpènes cycliques. En effet, on peut concevoir facilement qu'il soit à l'origine du limonène, du terpinolène et de l' α -terpinéol (**fig.10**). Il peut également donner le cation terpényle-4, précurseur immédiat commun de l' α - et du γ -terpinène ainsi que du terpinène-4-ol. [43].

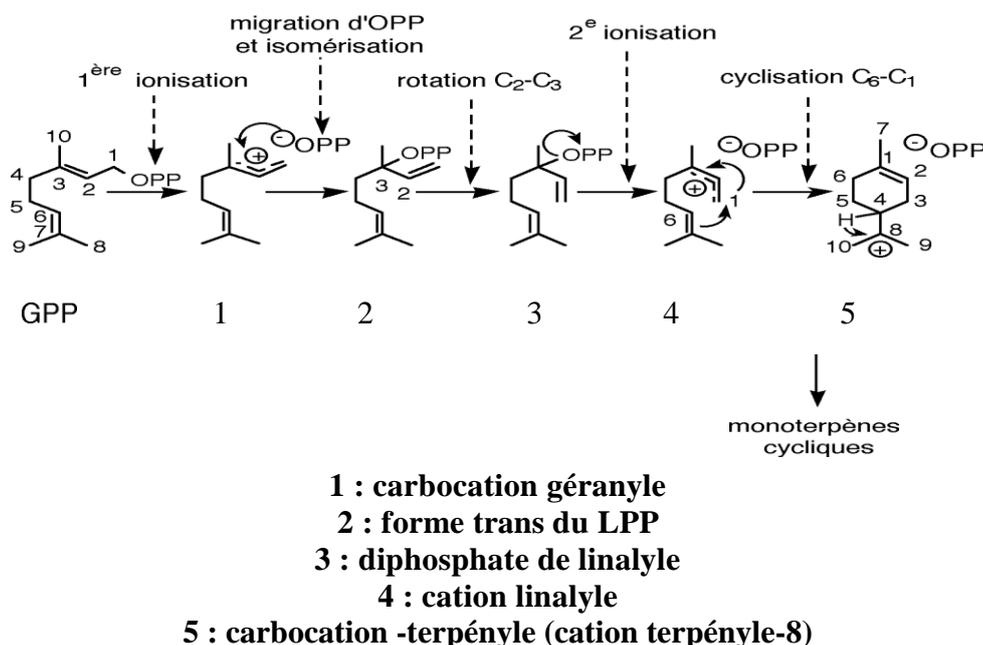


Fig.9 : Mécanisme réactionnel d'ionisation-cyclisation du diphosphate de géranyle via le diphosphate de linalyle [43].

Certains monoterpènes monocycliques tels, le limonène, le terpinolène, l' α -terpinène, etc., présentent une structure chimique apparentée et peuvent être métaboliquement interconvertis. Ainsi, **Koba et al., (2004) [75]** ont montré que le terpinène-4-ol peut donner l' α - ou le γ -terpinène par simple déshydrogénation. Par la

même réaction, le γ -terpinène peut donner le p-cymène, précurseur immédiat commun de thymol et de son isomère, le carvacrol.

En effet, **Lamarti et al.(1994) [43]** ont rapporté que les monoterpènes cyclases produisent à partir du GPP une variété de monoterpènes cycliques. Les réactions catalysées par ces enzymes sont régiospécifiques et exigent des ions bivalents afin de neutraliser la charge négative du groupement diphosphate et d'aider ainsi à l'ionisation du GPP.

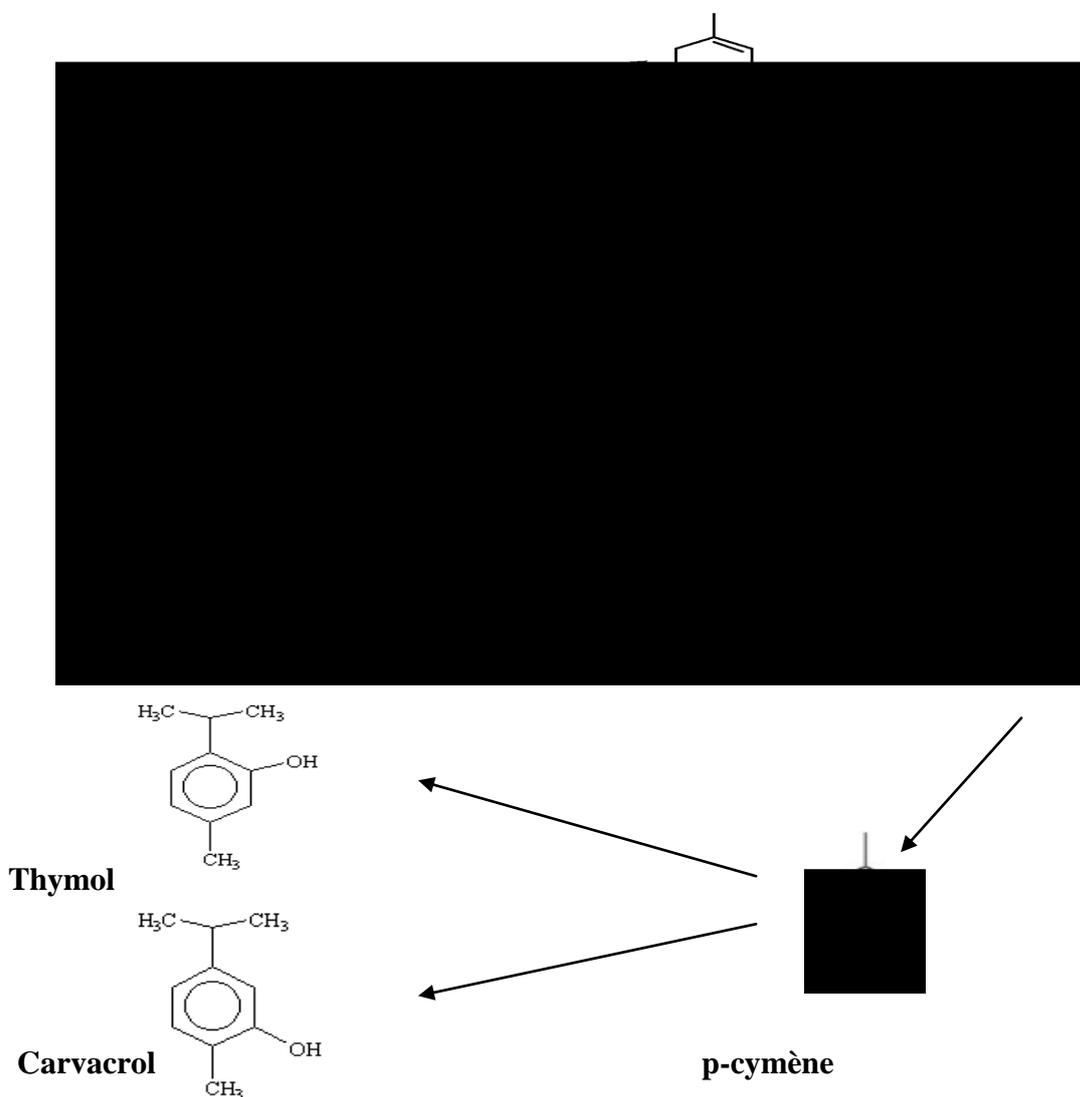


Fig.10 : Voies de biosynthèse des monoterpènes cycliques, dont le thymol à partir de différents cations terpényles [21,75].

I.9.2 Extraction de thymol

Le thymol isolé par cristallisation sous l'action du froid, ou bien, par traitement de l'huile essentielle de thym avec une solution de soude caustique, les hydrocarbures formant la couche de verseur sont éliminés, et la solution inférieure contenant le thymolate de sodium ($C_{10}H_{13}ONa$) est neutralisée avec l'acide chlorhydrique. Le thymol vient surnager à la surface de liqueur; on le recueille par décantation où en employant un dissolvant approprié suivie d'une recristallisation alcoolique. [72]

I.10 Activité des huiles essentielles et de ces composés

Les huiles essentielles, par leurs propriétés nombreuses et variées, sont utilisées dans différents secteurs : en parfumerie, en cosmétologie, en conserverie, en pâtisserie, dans la fabrication des mastics, des condiments, des insecticides, et dans les industries pharmaceutiques. Ceci a été prouvé par plusieurs études [7,9,18,25,76].

I.10.1 Activités biologiques

I.10.1.1 Industrie alimentaire

Les plantes aromatiques, les épices et leurs huiles essentielles sont utilisées depuis des siècles dans les préparations alimentaires non seulement pour la saveur qu'elles apportent mais également pour empêcher le développement des contaminants alimentaires [47,52,55].

Plusieurs travaux ont montré que les HE de thym, de cannelle, d'origan, de romarin, de clou de girofle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables d'infections alimentaires. Ceci est dû à la présence dans ces dernières de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes [13,15,77,78].

I.10.1.2 Désinfection des locaux

Grâce à leur pouvoir antiseptique, les huiles essentielles peuvent permettre d'assainir l'air ambiant ou les systèmes de ventilation, notamment dans le milieu hospitalier, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air et limiter ainsi la propagation des germes microbiens [79].

I.10.2 Activités pharmacologiques

Depuis longtemps, les huiles essentielles sont utilisées en thérapeutique. Les applications thérapeutiques des huiles essentielles sont vastes. Elles requièrent de bonnes connaissances de ces substances et du fonctionnement du corps humain [65]. L'usage des huiles essentielles en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables [2].

De nombreuses huiles essentielles se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produits pharmaceutiques : sirop, gouttes, gélules. Elles rentrent aussi dans la préparation d'infusion telle que : la verveine, le thym, la menthe et autres. Elles ont une action anti-inflammatoire, antiseptique, désodorisante, insecticide et antioxydante [8,80].

I.10.2.1 Activité antioxydante

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles sont depuis peu massivement étudiées. Les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants [81]. Le thymol et le carvacrol sont les composés les plus actifs [55].

L'activité antioxydante des huiles essentielles est également attribuée à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques: le linalool, le 1,8-cinéole, le géraniol/néral, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes: γ -terpinène et l' α -terpinolène [81].

Jukie et Milos (2005) [82] ont montré dans une étude portant sur l'huile essentielle de thymus (*Thymus vulgaris*), que les chemotypes phénoliques (thymol et carvacrol) et non phénoliques (linalool) sont capables de réduire le radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl, avec un effet plus élevé enregistré pour les chemotypes phénoliques.

I.10.2.2 Activité anti-inflammatoire

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite [83]. Le potentiel thérapeutique très varié des huiles essentielles a attiré, ces dernières années, l'attention de chercheurs quant à leur possible activité contre le cancer. De ce fait, les huiles essentielles et leurs constituants volatils font dorénavant l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux [81].

I.10.2.3 Activités anti-microbiennes des huiles essentielles.

Il est connu depuis l'antiquité que les huiles essentielles présentent une activité antiseptique non négligeable. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines : pharmacie, cosmétique, agro-alimentaire...etc. à la fin du XIX^e et au début du XX^e siècle, plusieurs travaux scientifiques relataient l'action antiseptique de plusieurs huiles essentielles [24].

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, comme les bactéries endocanaliaires ou la microflore vaginale, et d'origine fongique, comme les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes. Elles présentent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des anti-septiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre [79].

Des études récentes ont prouvé que les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures et que leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. [6,7,15,84].

Sacchetti et al. (2005) [85] ont étudié l'activité antifongique de 11 HE en utilisant cinq levures de pourritures d'aliments : *Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosacchomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Yarrowia lypolitica*. Les résultats obtenus ont montré que l'HE de *Thymus citriodorus* x et *Cymbopogon citratus* étaient les plus efficaces pour inhiber les 5 levures testées. Les effets antifongiques du thym sur les différentes levures et moisissures ont été décrits dans plusieurs études [86,77]. En effet, l'effet anticandidosique de l'HE de thym *in vitro* a été rapporté par plusieurs auteurs [2,87,88,89].

Dans la même optique, **Ouraini et al. (2005) [2]** ont montré que l'HE de thym (*Thymus saturejoides* L.) a des propriétés antifongiques *in vitro* sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. **Klaric et al. (2006) [90]** ont également décrit l'effet antifongique de l'HE de *Thymus vulgaris* sous forme gazeuse sur *Aspergillus*, *Penicillium* spp, *Cladosporium* spp, *Trichoderma* spp, *Rhizopus* spp, *Mucorspp*.

I.10.2.3.1 Activité liée à la composition chimique des huiles essentielles

Le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne des HES est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans les HES. Ainsi *in vitro*, une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison des terpènes hydrocarbures a été observée [7]. La structure moléculaire semble présenter un rôle aussi important que la présence d'oxygène dans la molécule de terpène: la caractéristique lipophile du squelette hydrocarboné ainsi que la propriété hydrophile des groupes fonctionnels sont déterminantes vis-à-vis de l'activité antimicrobienne des tetrpénoïdes [7]. Sur cette base, l'ordre d'activité antimicrobienne de ces composés est le suivant: [2,23]

Phénols >Alcools> Aldéhydes> Cétones> Oxydes> Hydrocarbur > Esters

Stylo et al. (2005) [91] ont montré que la nature antimicrobienne des huiles essentielles est apparemment en rapport avec leur fort contenu phénolique en particulier en thymol et carvacrol. Ces résultats sont en accord avec ceux donnés par [37,63]. Ils ont prouvé que : plus les teneurs phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces.

Pinto et al., 2006 [88] ont rapporté que les espèces du genre *Thymus* (*T.vulgaris*, *T.zygis*), qui contiennent une quantité importante de phénols, présentent un large spectre d'activité sur les moisissures et champignons filamenteux.

Kaloustian et al. (2008) [24] confirment que ce sont les phénols (thymol, carvacrol) qui donnent à l'huile essentielle le caractère antibactérien. Par ailleurs, ces résultats sont en accord avec ceux donnés par d'autres études [78,92].

Bouhdid et al (2006) [55] ont montré que les huiles essentielles de *Corydothymus capitatus* et de *Thymus vulgaris thymoliferum* témoignent d'une activité antibactérienne intéressante surtout contre les bactéries Gram positives. En effet, *L. monocytogenes*, souche hautement pathogène, présente une sensibilité élevée à ces deux huiles. Cette grande activité est liée à la présence du carvacrol et du thymol qui sont majoritaires dans ces deux huiles.

Les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques dans des préparations pharmaceutiques [93].

Par ailleurs en 1998, **Hilan et Sfeir [94]** ont prouvé que le thymol est 20 fois plus antiseptique que le phénol. L'effet antifongique d'HE est dû essentiellement à la nature de leurs composés majeurs mais en partie à la nature de leurs composés mineurs [48].

Cosentino, Tuberoso et al., (1999) [63] ont montré que les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité; la totalité de la composition chimique doit être prise en compte. De même, **Lahlou, (2004) [18]** a prouvé que l'activité (antimicrobienne, antivirale, insecticide, larvicide et ovicide) des huiles essentielles est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément.

Dans une étude in vitro sur des microbes pathogènes situés dans les aliments, **Rota et al.(2008) [25]** ont montré que la totalité des huiles essentielles avait une plus grande activité antimicrobienne que les mélanges des composants majeurs, ajoutant que les composants mineurs sont critiques à l'activité et peuvent avoir un effet synergique ou une influence potentielle sur l'huile essentielle. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par [49]. En effet, **Haddaf et al.(2004) [95]** ont étudié l'activité antifongique de deux espèces de thym, ils ont rapporté une activité antifongique plus élevée pour l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* bien que sa teneur en phénols (thymol et carvacrol) de 36.70% soit inférieure à celle du *Thymus numidicus* qui est de 65.87%. Ils ont conclu que d'autres constituants pourraient intervenir dans le pouvoir antifongique de cette huile. En revanche, les composants oxygénés purs ont aussi montré une activité supérieure par rapport aux HES dans lesquelles ils se trouvent. **Pinto et al., 2006 [88]** ont testé séparément l'activité de carvacrol, p-cymène et γ -terpinène (qui sont des constituants de l'HE de *Thymus pulegioides*) sur *Candida spp.*, sur *Aspergillus spp* et autres dermatophytes. Les résultats obtenus montrent une activité antifongique plus importante du carvacrol sur *Candida spp.* et *Aspergillus spp.* par rapport à l'action de l'huile prise dans son ensemble.

Dans le même optique, **Kaloustian et al., 2008 [24]** ont trouvé que les phénols (thymol et carvacrol) purs présentent une meilleure activité que les huiles essentielles pures. La présence de traces d'autres terpènes dans ces huiles pourrait expliquer cette différence d'activité. Par ailleurs, une étude menée par **Botelho et son équipe (2007) [33]** a montré que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lippia sidoides* est inférieur comparativement à celle de thymol et de carvacrol testés séparément, en suggérant que les composants mineurs peuvent contribuer à un effet antagoniste sur l'activité de l'huile essentielle.

I.10.2.3.2 Type de microorganismes ciblés

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des HES est le type de microorganismes ciblés. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis à vis des HES.

Lahlou (2004) [18] a souligné que la sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé car une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet. C'est pour cela qu'il est important de mentionner la dénomination complète, le Gram des microorganismes ainsi que l'espèce botanique et le chémotype de l'huile essentielle.

En effet, **Marzouk** et son équipe (2006) [49] ont trouvé que les bactéries à Gram positif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif. Cette affirmation n'a cependant pas été confirmée par d'autres travaux. La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram [23,37], ou dépend des huiles essentielles utilisées [8]. D'autres travaux rapportent que les bactéries à Gram négatif apparaissent plus résistantes que celles à Gram + vis-à-vis des HES [34,37,63].

I.10.2.3.3 Mode d'action antimicrobienne des huiles essentielles

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HES, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire [96]. De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HES sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, la fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules [7,11,15,23,87]. **Cox et al.(2000) [97]** ont rapporté que l'activité antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie de sa rupture entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure. En effet, **Glodani et Kaloastian (2006) [87]** ont noté que les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures. De même, **Gideon et al. (2007) [91]** ont rapporté que les phénols sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane et des parois cellulaires des bactéries.

I.10.3 Effet synergique entre les huiles essentielles et d'autres substances antimicrobiennes

À défaut d'antifongiques nouveaux et plus puissants, des travaux ont permis de favoriser l'action antifongique de molécules comme l'amphotéricine B de telle façon que la quantité nécessaire soit inférieure et permette alors d'espérer une diminution des effets secondaires indésirables. Ainsi, **Glordani et Kaloustin (2006) [87]** ont montré que l'utilisation d'huiles essentielles en concomitance avec les médicaments tels que l'amphotéricine B pourrait induire une diminution de la quantité de médicaments nécessaire à une inhibition de la croissance fongique. Cette diminution pourrait alors laisser espérer une baisse des effets secondaires (notamment la forte toxicité rénale) liés à l'utilisation de ce médicament et la suppression des mutants résistants à l'AmB.

Il existe d'autres composés volatils qui ont prouvé une activité cytotoxique contre diverses lignées cellulaires cancéreuses (gliomes, cancer du côlon, du poumon, du foie, du sein, etc.). Le géranjol, un alcool monoterpénique très fréquent dans les huiles essentielles, diminue la résistance des cellules cancéreuses du côlon (TC118) envers le 5-fluorouracil, un agent anticancéreux. De ce fait, le géranjol potentialise l'effet inhibiteur de la croissance tumorale du 5-fluorouracil [98].

I.10.4 Aperçu sur les techniques d'étude du pouvoir antimicrobien des HE.

L'activité antimicrobienne des HE est le sujet de plusieurs études scientifiques *in vitro* depuis plusieurs années. Cependant, les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur [99].

A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des HES les plus couramment utilisées sont la "méthode de diffusion dans l'Agar" et la "méthode de dilution". Dans la première méthode, les HES sont ajoutées sur des disques ou dans des puits creusés dans l'Agar.

Dans la seconde méthode, les HES sont ajoutées dans des bouillons d'Agar ou d'autres liquides dans lesquels les bactéries sont présentes. Ces différentes techniques sont répertoriées et décrites dans différentes publications [18,100].

CHAPITRE II
CHAPITRE II

La peau

*LA PEAU***II.1 Structure et fonctions de la peau**

La peau, ou membrane cutanée, recouvre la surface externe du corps. Elle constitue l'organe le plus lourd (masse) et le plus étendu (superficie) du corps humain. Chez l'adulte, elle couvre plus ou moins 2 m² et pèse de 4,5 à 5 kg, soit environ 16 % de la masse corporelle totale. Son épaisseur varie de 0,5 mm sur les paupières à 4 mm sur les talons ; elle est de 0.5 à 2 mm sur la majeure partie du corps. Sur le plan structural, la peau comprend deux couches principales (**Fig.11**). La partie superficielle, la plus mince, se compose de tissu épithélial et est appelée épiderme (epi: sur). La partie la plus profonde, et la plus épaisse, se compose de tissu conjonctif et est nommée derme [101,102]. En dessous du derme se trouve la couche sous-cutanée, qui n'appartient pas à la peau proprement dite ; elle est appelée fascia superficiel ou encore hypoderme, et se compose de tissu aréolaire et de tissu adipeux. La complexité anatomique et physiologique de la peau humaine lui confère des propriétés complexes [103].

Les recherches effectuées durant les 20 dernières années dans les domaines de la dermatologie et de la biologie cutanée ont profondément enrichi les connaissances sur ses mécanismes physiologiques et modifié la perception de cet organe. La peau est la première ligne de défense vis-à-vis du monde extérieur mais permet en même temps d'entretenir des relations avec celui-ci. Son intégrité est nécessaire à la vie tant pour son incidence sur la santé de l'individu que pour son bien-être. Outre sa fonction barrière, la peau est aussi le siège du toucher et possède un rôle de synthèse (vitamine D2), d'élimination (principalement fer et cholestérol par la sueur, le sébum, les poils et les cellules desquamantes) et d'échanges thermiques et gazeux [101,104].

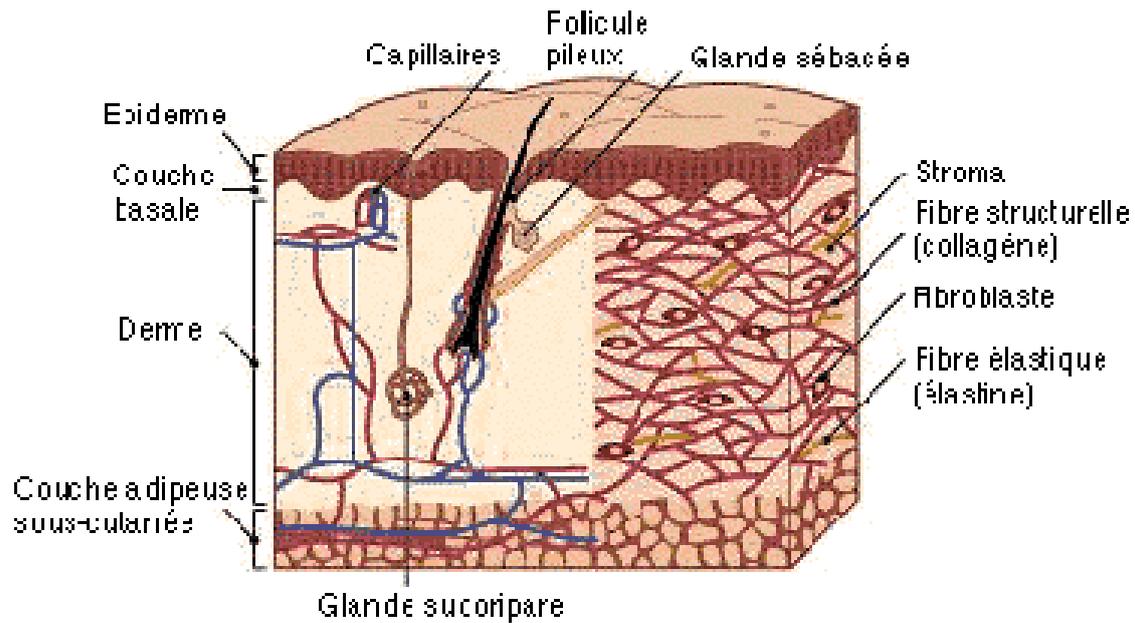


Fig.11: Structure de la peau [105]

II.2 Epiderme

La partie la plus superficielle de la peau est représentée par l'épiderme. Ce tissu est dérivé embryologiquement de l'ectoblaste. C'est une couche continue d'un épithélium malpighien kératinisé, dont plusieurs types de cellules entrent dans la composition de l'épiderme. Les kératinocytes en grande majorité (90 - 95%), les mélanocytes, les cellules de Langerhans et cellules de Merkel [101,106]. Son épaisseur varie largement en fonction du site anatomique ; la moyenne est de 40-50 μm mais elle augmente jusqu'à 80 μm sur le poignet et le dos de la main et jusqu'à 400 μm au bout des doigts [105,106]. Sa fonction essentielle est représentée par la formation de la couche cornée, stade ultime de la différenciation cellulaire, permettant la réalisation d'une barrière efficace entre l'organisme et le milieu extérieur [107]. D'après Cuminet (1999) [106], de la profondeur à la surface, on observe: (fig.12,13)

Le *stratum germinativum*, ou couche des cellules basales. Elle est composée de cellules germinatives formant une couche mono-cellulaire à disposition palissadique. Il s'agit d'une zone d'échange avec le derme sous-jacent, et d'ancrage par le biais de la jonction dermo-épidermique. Cette jonction est élaborée conjointement par les fibroblastes dermiques et les kératinocytes.

Le *stratum spinosum*, ou corps muqueux de Malpighi, est composé de 3 ou 4 couches d'éléments polyédriques tendant à s'allonger horizontalement vers les couches superficielles. Dès ce niveau, les cellules sont capables de synthétiser de la kératine. Leur noyau est arrondi et de volume supérieur à celui de la couche basale. Ces cellules sont pourvues de prolongements spiculés porteurs de desmosomes. Ces desmosomes sont les moyens de fixation intercellulaires, auxquels s'attachent les tonofilaments intracytoplasmiques.

Le *stratum granulosum*, qui correspond à 3 couches de cellules granuleuses aplaties et fusiformes, situées immédiatement sous la couche cornée. Ces cellules contiennent de la kératohyaline, précurseur de la kératine.

Le *stratum corneum*, ou couche cornée. Elle est composée de cellules mortes, superposées, hexagonales et allongées, régulièrement ordonnées, anuclées et complètement kératinisées. Le nombre de couches cellulaires est très variable : de 15 à 20 au niveau de l'abdomen et du dos, plus de 100 au niveau palmaire. Ces cellules sont éliminées de façon ordonnée, selon le processus de desquamation.

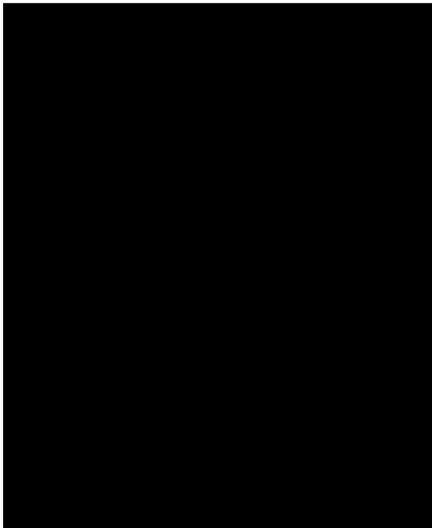


Fig. 12 : Schéma de l'organisation histologique de l'épiderme d'après Franceschini. [107]

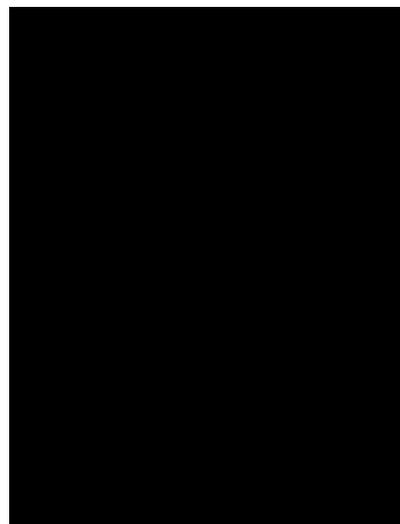


Fig. 13 : Schéma du processus de maturation des kératinocytes d'après Lavker et Maltosky. [107]

II.3 Absorption cutanée

La voie cutanée est très largement utilisée pour l'administration de médicaments. En effet, elle offre la possibilité de pouvoir cibler les différentes couches de la peau (administration percutanée) ou bien la voie sanguine pour une administration systémique du principe actif (voie transcutanée). Le devenir du principe actif dans la peau dépend des propriétés de celle-ci (intégrité, âge...) mais aussi des caractéristiques physico-chimiques du principe actif (taille, forme, structure et propriétés chimiques de la molécule), de la forme galénique choisie et des excipients [102,105,108].

D'un point de vue cinétique, la pénétration dans la cornée se découpe en deux phases. Une première phase de latence qui peut être considérée comme une phase de 'charge en produit' dont la durée dépend des propriétés physico-chimiques des actifs. Une seconde phase, d'équilibre, durant laquelle l'actif est capté par un flux dermique continu. la substance continue ainsi à diffuser dans l'épiderme et le derme en trois temps : tout d'abord, un transport de (s) l'actif(s) jusqu'à la zone d'absorption (dépendant de la viscosité de ces derniers et de leur véhicule) ; puis, la libération de ces actifs (fonction de l'affinité de la préparation pour la peau) ; enfin, les étapes d'absorption et de résorption (dépendantes uniquement de(s) actif(s) étudié(s) et dont les cinétiques seront données par la Loi de Fick). Ainsi, ils ont noté que le ciment lipidique de la couche cornée accélère le passage des molécules amphiphiles, et freine la diffusion des substances hydrophiles [108].

La maîtrise du degré de pénétration du (ou des) principe(s) actif(s) contenu(s) dans la forme pharmaceutique pour application locale sera l'objectif prioritaire du développement galénique. Elle passe par la définition préalable du niveau d'activité et de l'effet attendu de la forme envisagée; le **tableau 5** précise le degré de pénétration à conférer en fonction du type d'efficacité recherché [109].

Tableau 5 : Influence du degré de pénétration sur l'activité

Niveau d'action	Effet attendu	Degré de pénétration
Activité de surface		
Surface	Protection Antiseptique Antisolaire, etc.	Nulle
Couche cornée	Emolient Exfoliant, etc.	Faible
Activité épidermique		
Epiderme	<ul style="list-style-type: none"> -Antiseptique Antifongique - Anti-inflammatoire - Antiphlogistique - Anesthésique - Antipruritique - Antihistaminique, etc. 	Moyenne
Activité dermique ou systémique		
Derme	Hormonal Cardiovasculaire, etc.	Elevée

II.4 Aspects qualitatifs et quantitatifs de l'absorption cutanée

La couche cornée, faite de cornéocytes non-vivants fermement liés et de voies de transport non perceptibles telles les glandes sébacées et sudoripares, peut être envisagée comme une membrane passive. La plupart des substances la traverseront proportionnellement au gradient de concentration entre le côté supérieur et inférieur de la membrane. Ainsi on peut appliquer la loi de Fick, du moins tant que la concentration en surface est grande et la concentration dans l'épiderme faible.

Pour parvenir à l'épiderme vivant, c'est à dire traverser le stratum corneum, une molécule a trois possibilités. Elle peut diffuser entre les cellules, à travers les cellules ou à travers les follicules pilo-sébacés ou les glandes sudoripares (**fig.14**) [102,105].

L'importance relative de chacune des voies paraît être influencée par les caractéristiques du produit appliqué et celles de la surface cutanée.

✓ Diffusion intracellulaire : autrefois considérée comme la voie majeure, désormais controversée;

✓ Diffusion intercellulaire (espaces lipidiques) : voie préférentielle pour de nombreuses molécules, même polaires comme l'eau. Les modalités de pénétration restent encore obscures;

✓ Diffusion à travers les annexes cutanées : bien que la surface couverte par les annexes cutanées soit inférieur à 1% de la surface cutanée, l'absence de barrière cornée au niveau de ces annexes favorise l'absorption des molécules. Cette voie interviendrait au cours des premières minutes de diffusion des molécules plus ou moins polaires. En fait, elle bénéficie surtout aux molécules de grande taille et de faible polarité pour lesquelles elle est la seule issue possible.

En effet, selon les mêmes auteurs, la plupart des molécules traversent la couche cornée en empruntant la voie intercellulaire. [102,105]



Fig.14: Voies principales de pénétration [102].

II.5 Formes galéniques destinées à la voie cutanée

Les préparations destinées à être appliquées sur la peau, représentent certainement une des plus anciennes formes pharmaceutiques, puisqu'elles ont été appliquées soit pour soigner les blessures, soit pour embellir la peau avec les fards, les onguents et les poudres de beauté, ancêtres des produits cosmétiques modernes.

En effet, la formulation des préparations destinées à la voie cutanée doit tenir compte des caractères propres de la peau (épiderme, derme, hypoderme) et de ses annexes (glandes sébacées et sudoripares, follicules pileux) ainsi que des caractères physico-chimiques du principe actif qui lui permettront ou non de franchir la barrière cutanée afin d'exercer une action générale.

II.5.1 Préparations semi-solides pour application cutanée

Les préparations semi- solides pour application cutanée sont destinées à être appliquées sur la peau ou sur certaines muqueuses afin d'exercer une action locale ou transdermique de principes actifs. Elles sont également utilisées pour leur action émolliente ou protectrice. Elles présentent un aspect homogène [110].

Plusieurs catégories de préparations semi-solides pour application cutanée peuvent être distinguées : [110]

- Les pommades (hydrophobes, absorbant l'eau, ou hydrophiles);
- Les crèmes hydrophobes ou hydrophiles;
- Les gels hydrophobes ou hydrophiles;
- Les pâtes;
- Les cataplasmes.

II.5.1.1 Pâtes

Les pâtes sont des préparations pour application cutanée contenant de fortes proportions de poudres finement dispersées dans l'excipient. On distingue : [110]

- pâtes à corps gras où les excipients sont des corps gras ou des mélanges de corps gras;
- pâtes à l'eau sont des préparations dont l'excipient est à base d'eau et de glycérine.

II.5.2 Autres formes administrées sur la peau

A côté des pommades, crèmes, pâtes et gels, d'autres préparations plus liquides sont aussi destinées à être appliquées sur la peau : ce sont les liniments, les lotions et surtout des solutés divers. Pour l'application sur la peau on peut encore citer les poudres dermatologiques, les cataplasmes et les sinapismes [111].

CHAPITRE III

CHAPITRE III

Microorganismes et Pathologies

Microorganismes et Pathologies

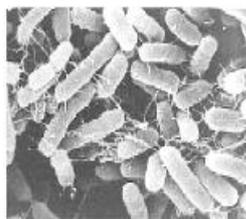
MICROORGANISMES ET PATHOLOGIES

L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes (bactéries, virus, parasites, champignons), possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus. Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave [112].

Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent des millions de personnes dans le monde entier, et causent de lourdes pertes à l'économie. Aux Etats Unis seuls, ces pertes sont d'environ 20 billions de dollars par an. De nombreux programmes ont été conduits pour découvrir et développer de nombreux agents antimicrobiens d'origine biologique. Ainsi 27 antibiotiques et 12 antifongiques étaient en développement en 1998 contre les infections bactériennes et fongiques. Ceci illustre l'effort sérieux exercé pour la lutte contre les maladies infectieuses [112].

III.1 Définition de microorganismes

Les microorganismes sont définis historiquement comme des organismes vivants trop petits pour être distingués à l'oeil nu et généralement formés d'une seule cellule. Ce terme est donc utilisé pour désigner des organismes unicellulaires ou constitués d'un nombre limité de cellules (**fig.15**).



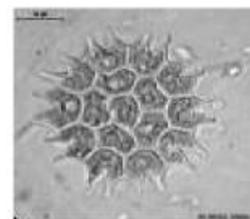
Bactérie
Salmonella
Enteritidis



Champignon
Candida
albicans



Protozoaire
Trypanosoma
brucei



Protophyte
Pediasium
albicans

Fig.15: Différentes classes de microorganismes [113]

Comparativement à l'homme, les microorganismes sont nettement plus nombreux et ont une capacité extraordinaire à s'adapter à son environnement. Or, plus la population humaine augmente, plus elle permet aux organismes pathogènes de se développer, et de transmettre les maladies.

Il est donc important de posséder des moyens efficaces pour lutter contre ces microorganismes néfastes à l'Homme [113].

III.2 Infections bactériennes

Les bactéries sont des cellules procaryotes, leur ADN n'étant pas localisé dans un noyau. Beaucoup contiennent des structures circulaires d'ADN extra-chromosomique appelées plasmides. Il n'y a pas d'autre organelle dans le cytoplasme que les ribosomes, qui sont de plus petite taille que ceux des cellules eucaryotes. À l'exception des mycoplasmes, les bactéries sont entourées par une paroi complexe, différente selon que la bactérie est à Gram positif ou négatif. De nombreuses bactéries possèdent des flagelles, des pili, ou une capsule à l'extérieur de la paroi (ANNEXE 1).

Aussi bien pour les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif la membrane cytoplasmique est formée d'une bicouche lipidique associée à des protéines. Dans les deux cas, le composant principal de structure de la paroi est le peptidoglycane, un réseau tridimensionnel de chaînes polysaccharidiques (composées de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique) et d'acides aminés. Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est constituée presque exclusivement de la couche de peptidoglycane, à laquelle sont associés des polymères d'acide teichoïque. Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus complexe. La couche de peptidoglycane est plus fine que celle des Gram positif, et elle est entourée par une membrane externe composée de lipopolysaccharides et de lipoprotéines. La partie lipopolysaccharidique de la paroi des Gram négatif comprend les molécules d'endotoxine (lipide A) qui contribuent au pouvoir pathogène bactérien (ANNEXE 1).

Les infections bactériennes sont responsables de maladies allant de l'angine bénigne aux épidémies de choléra et de peste. Les bactéries sont des micro-organismes remarquablement adaptables, à l'origine de maladies graves ou de simple colonisation de la peau. Elles sont capables de survivre et se multiplier dans l'environnement et certaines forment des spores qui survivent pendant des décennies. Un grand nombre d'entre elles parasite les animaux, et n'infecte l'homme que par hasard. D'autres ne peuvent survivre qu'au contact intime de leur hôte humain. Alors que la plupart des bactéries se répliquent en quelques heures ou jours, d'autres ont une croissance beaucoup plus lente, entraînant des infections chroniques difficiles à traiter.

En plus d'une grande diversité d'habitat, les bactéries ont un important potentiel d'adaptation génétique. Elles contiennent souvent de l'ADN plasmidique, capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes. Cette adaptabilité génétique peut accroître à la fois leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques [113].

III.3 Infections fongiques

Les Champignons ou Mycètes constituent aujourd'hui le cinquième règne du monde vivant appelé Fungi ou règne fongique. Actuellement, le règne fongique comprend plus d'un million d'espèces recensées à la surface de la planète [114].

Le règne des Fungi ou règne des mycètes est constitué d'organismes eucaryotes, principalement multinuclés dont les noyaux sont dispersés dans un mycélium avec paroi. Ce sont principalement des organismes terrestres dont les cellules sont organisées en un appareil végétatif primitif, le thalle. Chez la majorité des espèces fongiques, le thalle est formé d'un enchevêtrement de filaments; les mycéliums, pouvant donner naissance à des spores sexuées ou asexuées.

La plupart des mycètes sont saprophytes, excepté les champignons parasites responsables de certaines maladies et qui peuvent infecter les plantes et les animaux. Toutefois les agents des teignes, les dermatophytes, sont pour leur grande majorité des champignons strictement parasites. Le développement d'une pathologie fongique chez l'humain et l'animal dépend souvent de facteurs prédisposants comme l'existence de pathologies concomitantes (SIDA), d'événements associés (chirurgie, traitement antibiotique,...) ou de facteurs environnementaux (conditions d'élevages favorisant les contacts rapprochés,...) [115].

Les infections à levures ont vu leur incidence augmenter et leur localisation se diversifier. Parmi le genre *Candida*, le *Candida albicans* reste l'espèce la plus fréquemment rencontrée. En pathologie, *Candida albicans* est la cause, de 70 à 80 % des cas de candidoses humaines. C'est l'agent des mycoses cutanées (impétigo) et unguéales (intertrigos), des mycoses digestives (muguet et buccal), intestinales, biliaires et génitales, des mycoses broncho-pulmonaires, viscérales (abcès cérébraux) [2].

Les mycoses, situées au premier rang des infections cutanées, représentent une pathologie fréquemment évoquée en pratique dermatologique [116].

Dans la pathologie fongique ou mycosique, trois types de mycoses humaines sont fréquentes et universelles : les dermatophytoses, le Pityriasis versicolor et les candidoses cutanéomuqueuses. D'autres sont plus rares mais profondes et sévères [2] (tableau 6).

Tableau 6: Principaux types d'infections fongiques rencontrées chez l'homme (d'après Alcamo, 1997) [117].

Type d'infection	Agent responsable	Site d'infection
Cryptococcoses	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Poumon, cerveau (méninges et liquide céphalorachidien)
Candidoses	<i>C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. krusei</i>	Peau et muqueuses, tractus gastro-intestinal et sang
Dermatophytoses	<i>Trychophyton, Microsporum, et Epidermophyton</i>	Cuir chevelu, peau, ongles
Blastomycoses	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Visage, mains et pieds
Sporotrichoses	<i>Sporothrix schenckii</i>	Peau

Les infections fongiques restent les plus graves et leur fréquence a augmenté de façon considérable au cours des dernières années en raison principalement du nombre accru de patients immunodéprimés et d'interventions médicochirurgicales invasives [1].

III.4 Dermatophytoses

Les dermatophytoses sont des mycoses cutanées provoquées par des champignons filamenteux kératinophiles, les dermatophytes. Ces affections cosmopolites sont fréquemment rencontrées tant chez l'homme que chez l'animal. Contrairement à la plupart des autres champignons pathogènes, les dermatophytes sont des parasites obligatoires infectant des individus en bonne santé, et les infections dont ils sont responsables sont contagieuses [118,119,120]. L'infection superficielle à dermatophyte est l'une des maladies dermatologiques les plus communes [119,120] (fig.16).

Les dermatophytes [(du Grec derma = peau et phyton = plantes) sont des champignons filamenteux kératinophiles et kératinolytiques; ils utilisent comme substrats naturels des structures kératinisées. Les espèces saprophytes se nourrissent de débris kératinisés éliminés dans l'environnement, tandis que les espèces parasites envahissent le *stratum corneum* de l'épiderme ainsi que les phanères (poils ou cheveux, griffes ou ongles). Les dermatophytes pathogènes restent généralement confinés à ces tissus, et n'atteignent que rarement les couches les plus profondes de la peau et très exceptionnellement les organes internes.

On distingue trois groupes de dermatophytes selon leur habitat naturel, les dermatophytes anthropophiles, zoophiles, et géophiles [2,118]. Les espèces anthropophiles sont des parasites obligatoires de l'homme ; ils se transmettent essentiellement par contagion, interhumaine mais peuvent occasionnellement infecter l'animal. Les dermatophytes zoophiles ont pour réservoir une ou plusieurs espèces animales. Cependant, ils sont souvent isolés lors de dermatophytoses humaines, et certaines espèces comme *M. canis* et *Trichophyton verrucosum* infectent l'homme très facilement [120]. Les dermatophytes géophiles ou telluriques sont quant à eux des saprophytes vivant dans le sol. Toutefois, ils peuvent accidentellement être à l'origine d'une infection humaine ou animale, par exemple suite au contact entre une peau lésée et un sol contaminé [119].



Fig. 2. Dermatophytose à *T. rubrum* de la main.



Fig. 3. Dermatophytose à *T. rubrum* de la plante.



Fig.16: Infection superficielle à dermatophyte [119]

III.5 Moyens de lutte contre les microorganismes pathogènes

Les caractéristiques physiologiques et structurales des champignons diffèrent assez fortement de celles des bactéries, ce qui explique que la majorité des antibiotiques actifs contre les bactéries n'ont aucun effet sur la première catégorie d'organismes vivants (champignons) [115]. Il existe de nombreuses molécules utiles pour lutter contre les microorganismes pathogènes. Dans cette partie nous avons choisi de présenter quelques exemples de composés efficaces pour combattre les protozoaires, les champignons et les bactéries.

III.5.1 Contre les champignons

La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières (la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote) et d'autre part aux molécules antifongiques elles-mêmes qui sont soit fongistatiques, toxiques, ou qui peuvent engendrer des résistances [122]. Il existe plusieurs classes d'agents antifongiques: les polyènes, les dérivés azolés, les analogues nucléosidiques, les allylamines, les pneumocandines, et les sordarines [115].

La chronologie de la découverte des différents agents antifongiques est résumée sur la **Fig.17** et leurs formules chimiques sont représentées sur la **Fig. 18**.

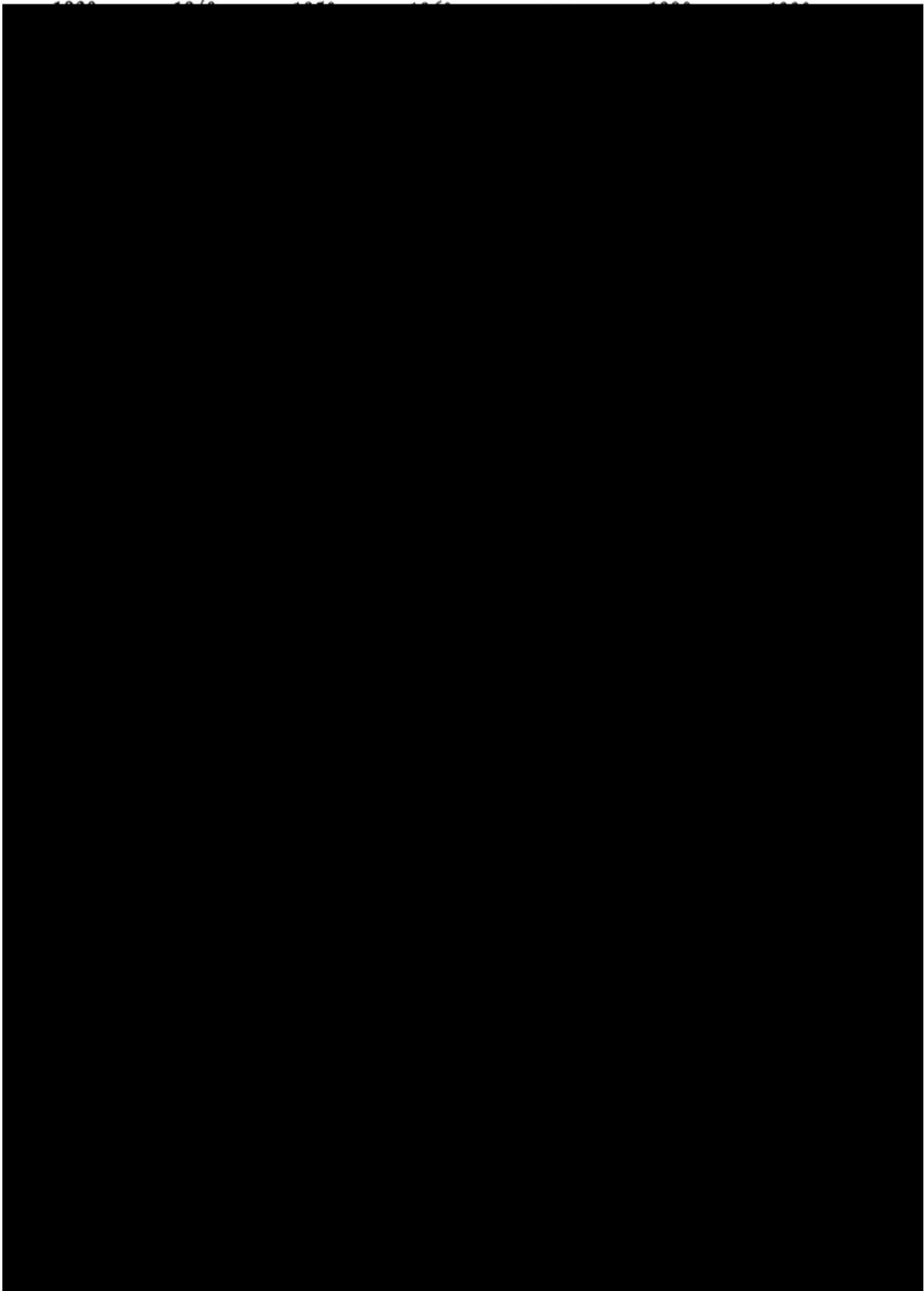
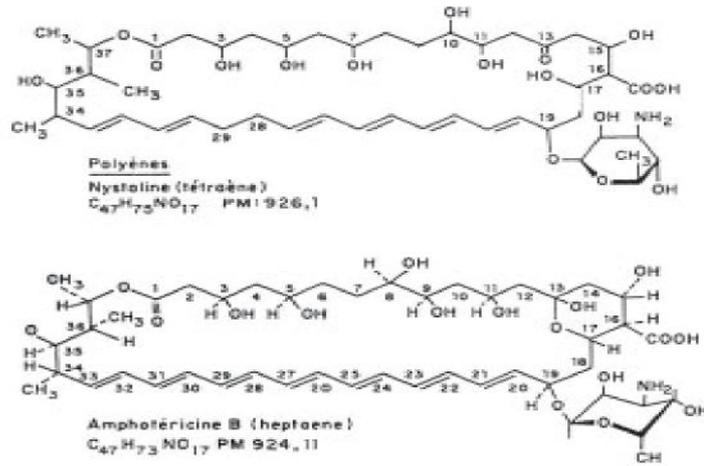
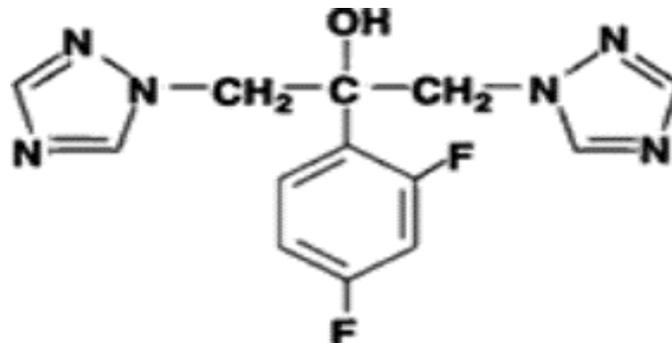


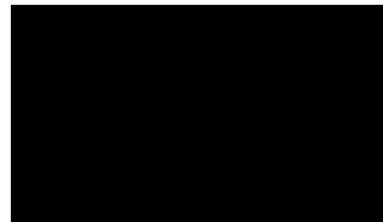
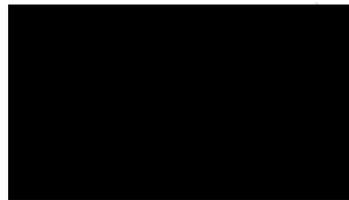
Fig.17 : Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques (d'après Sheehan et coll., 1999) [123].



Dérivés polyènes



Dérivés triazolés



Allylamines



sordarines

Fig.18 : Structures chimiques des principaux agents antifongiques [115]

III.5.2 Contre les bactéries

Pour soigner les maladies infectieuses, les antibiotiques sont les outils efficaces les plus fréquemment utilisés. Ces composés qui altèrent le fonctionnement normal des bactéries peuvent inhiber leur croissance (antibiotique bactériostatique) ou la détruire (antibiotique bactéricide). La plupart des antibiotiques inhibent des voies métaboliques de la bactérie. Chaque famille d'antibiotique possède son propre site d'action [50] (**voir ANNEXE 1**). Le traitement des mycoses cutanées bénéficie actuellement de nombreux antifongiques actifs et efficaces. Malgré cela, le problème des résistances de plus en plus nombreuses à un ou plusieurs antifongiques persiste encore [2,8,79,83].

L'accroissement des infections fongiques et le développement de souches résistantes aux médicaments utilisés. **Pan-Havard et al. (1991)** soulignent la nécessité de la découverte de nouveaux agents antifongiques. Pour cela les sécrétions végétales telles que les huiles essentielles sont intéressantes du point de vue leur pouvoir fongitoxique [87].

Partie Expérimentale

CHAPITRE IV

CHAPITRE IV

Matériel et Méthodes

MATERIEL ET METHODES

IV.1 Objectif de travail

L'objectif de ce travail est l'extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et son composé majoritaire, le thymol, dans le but de préparer deux pâtes médicamenteuses à effet antimicrobien une à base de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et l'autre à base de thymol extrait, suivie d'une étude microbiologique pour comparer l'activité antimicrobienne des deux produits. Cette activité a été évaluée sur des bactéries, des levures et des dermatophytes responsables de mycose humaine.

IV.2 Matériel chimique

Les constituants chimiques entre dans la composition des deux pâtes préparées sont: Glycérol, H₂O, bentonite, ZnO, acide salicylique, tetraborate de Na, formaldéhyde, CuSO₄.

IV.2.1 Analyse des constituants chimiques

La plupart des réactifs ont été acquis directement auprès de firmes de renommée, et n'ont pas nécessité de contrôle. Par contre certains produits ont du être soumis aux méthodes habituelles de purification pour s'assurer d'un haut degré de pureté [125].

IV.3 Matériel biologique

IV.3.1 Matériel végétal

IV.3.1.1 Description botanique

Le *Thymus fontanesii*, objet de notre étude, appelé « **Zaâteure** » en arabe [68] est une plante spontanée, raide, dressée, à rameaux étalés. C'est un petit arbrisseau qui ne dépasse pas 20 cm de hauteur à feuilles petites linéaires ou linéaires-lancéolées recourbées sur les bords de couleur vert foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes. Les épis florifères sont courts et étroits. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet visible d'avril à juin, à odeur très agréable et spécifique. Très commun dans les régions montagneuses, c'est une espèce endémique en Algérie.



Fig. 19 : *Thymus fontanesii*

IV.3.1.2 Récolte et séchage

Le thym, utilisé dans cette étude, a été identifié par le département de botanique, de l'Institut National d'Agronomie d'Alger comme étant le *Thymus fontanesii*. Des récoltes complémentaires de parties aériennes de notre espèce de thym ont été réalisées au mois de mars, mai, juillet 2007, durant les étapes de floraison (début, pleine et fin de floraison) de la plante dans leur habitat naturel situé dans la région de Lakhdaria dans la wilaya de Bouira (150km à l'est d'Alger). Elles ont été ensuite séchées au laboratoire à l'air libre à l'abri de la lumière et de l'humidité, puis conservées jusqu'au moment de l'extraction.

IV.3.2 Matériel animal

Espèce : lapin

Race : albinos

Élevage : animalerie de CRD - SAIDAL

Poids : 2.2 - 2.5 Kg

Couleur : blanche.

IV.3.3 Souches microbiennes testées

Les souches utilisées dans notre étude font parties de trois groupes de microorganismes, qui sont des pathogènes et des contaminants. Les tests sont réalisés sur cinq bactéries, deux levures, provenant essentiellement du Laboratoire de microorganisme de **CRD-SAIDAL** et deux dermatophytes provenant de **l'Institut Pasteur- d'Algérie (IPA)** (Tableau11).

Tableau 7 : Liste des souches microbiennes testées

Nom de la souche	N° ATCC	Gram	Famille	Source
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Micrococcaceae	CRD-SAIDAL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	Pseudomonadaceae	CRD-SAIDAL
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	Enterobacteriaceae	CRD-SAIDAL
<i>Enterococcus faecalis</i>	6569	+	Enterococcaceae	CRD-SAIDAL
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	Bacillaceae	CRD-SAIDAL
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601		Saccharomycetaceae	CRD-SAIDAL
<i>Candida albicans</i>	24433		Cryptococcaceae	CRD-SAIDAL
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>			Dermatophyte	Institut Pasteur d'Algérie
<i>Microsporum canis</i>			Dermatophyte	Institut Pasteur- d'Algérie

IV.3.3.1 Milieux de culture utilisés

Suivant la méthode employée dans l'essai et selon les souches choisies, nous avons utilisé comme milieux de culture les suivants : (ANNEXE 4)

- Gélose Nutritive, Bouillon et Gélose Mueller Hiuton pour les bactéries;
- Bouillon Nutritif et Milieu Sabouraud liquide pour les levures;
- Bouillon de Sabouraud dextrose agar, Sabouraud supplémenté d'actidione et de chloramphénicol et milieu de Borelli pour les dermatophytes.

IV.4 Extraction de l'huile essentielle

Dans cette étude, deux méthodes d'extraction ont été utilisées : l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau. L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée au niveau du laboratoire de synthèse pétrochimique de Boumerdès. Pour ce faire, deux appareillages ont été utilisés pour extraire l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

IV.4.1 Hydrodistillation

100g de la matière végétale est introduite dans un ballon de deux litres, imprégné d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant une heure et demi à deux heures. Les vapeurs chargées d'huile essentielle; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter (Fig.20), l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.



Fig. 20: Système de distillation par hydrodistillation en laboratoire

IV.4.2 Entraînement à la vapeur d'eau

100g de matériel végétal sec sont placés dans un ballon (B) qui surmontent l'eau en ébullition, les vapeurs; en traversant la plante font éclater les cellules et entrainer avec elles l'huile essentielle. Après condensation et liquéfaction; l'huile surmonte l'eau dans l'ampoule de décantation (**Fig.21**).

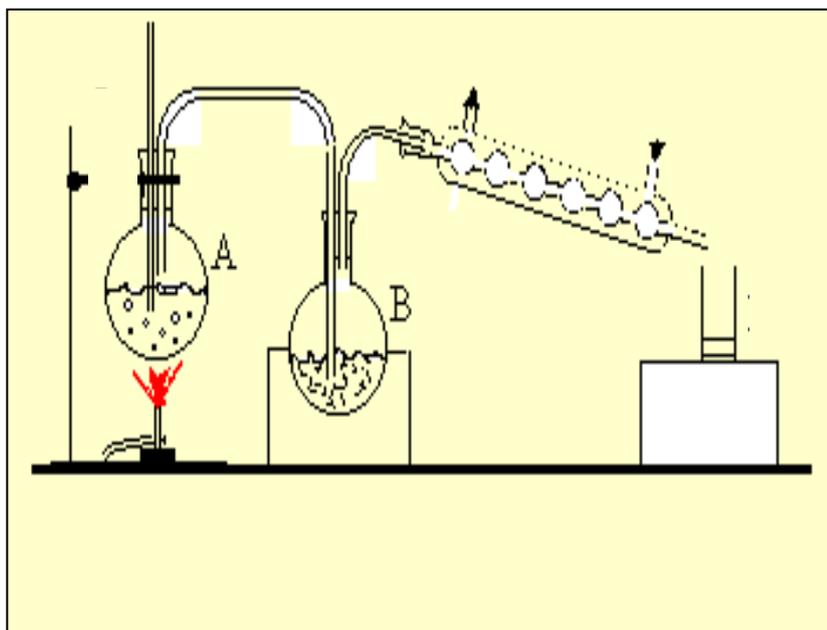


Fig.21: Système de distillation par Entraînement à la vapeur d'eau

IV.5 Calcul de rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traité [166].

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

R : Rendement en extraits fixes en g /100g de matière sèche

M_{HE} : quantité d'extrait récupérée exprimée en g;

M_S : quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

Les huiles essentielles sont recueillies et conservées au réfrigérateur à 4°C dans des bouteilles sombres pour les préserver de la chaleur.

IV.6 Extraction de thymol

Mode opératoire

Verser dans une ampoule à décanter 10,0ml d'huile essentielle et ajoute la quantité nécessaire d'une solution de NaOH à 25%. Agiter énergiquement le mélange et laisser reposer 24 heures pour la séparation complète de la phase aqueuse. Cette phase contient le thymolate de sodium qui doit être traité par une solution d'acide fort alors le thymol précipite. Pour la purification du thymol obtenu est utilisée la recristallisation alcoolique.

IV.7 Analyse de l'huile essentielle et de son thymol extrait

IV.7.1 Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Toutes les méthodes d'analyse physiques et chimiques des huiles essentielles extraites sont réalisées suivant la norme AFNOR [17] (ANNEXE 2).

IV.7.2 Identification chimique de thymol extrait

Toutes les méthodes d'analyse chimiques de thymol extrait sont représentées dans la pharmacopée européenne 4^{ème} édition [125] (ANNEXE 2).

IV.7.3 Analyse chromatographique d'HE et de son thymol extrait

Les analyses de la composition chimique de nos huiles essentielles et de thymol extrait ont été réalisées par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Cette dernière est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard (**série HP 5980**) couplé avec un spectromètre de masse (**série HP 5772**). Cette technique permet de déterminer simultanément le nombre de constituants de l'essence, leurs concentrations respectives, et leurs ordres de sorties, qui renseignent sur la volatilité, c'est à dire de leurs masses moléculaires, et de leurs polarités.

Cette analyse a été effectuée au laboratoire de chimie organique (chromatographie) au centre de recherche et de développement (C.R.D) de SONATRACH (Boumerdes) selon les conditions opératoires suivantes :

CPG :

Colonne capillaire **5% Phényl Méthyl Siloxane** possède les caractéristiques suivantes :

- longueur : 30m
- diamètre interne : 0.25mm
- épaisseur du film : 0.25µm

Les conditions opératoires sont :

- La température de l'injecteur splitless : 250°C
- La programmation de température : de 40°C à 250°C à raison de 6°C/mn ;
- Le gaz vecteur : He à 1ml/mn (vitesse linéaire moyenne = 36 cm/sec)

Spectromètre de masse :

- Les températures de la source et du quadripôle sont fixées respectivement à 230°C et 150°C ;
- L'énergie d'ionisation 70eV ;
- Gamme de masse : 35 à 400

IV.8 Formulation des pâtes

Pour pouvoir réussir une mise en forme adéquate, il fallait procéder au développement c'est-à-dire prendre un médicament à base de mêmes principes actifs déjà commercialisé et d'en faire l'équivalent. Donc notre objectif est de développer deux pâtes antimicrobiennes, l'une à base de l'essence de *Thymus fontanesii* et l'autre à base de son thymol extrait.

Mode de préparation

Les constituants sous forme de poudre sont finement pulvérisés et tamisés (la bentonite, de l'oxyde de zinc, tetraborate de sodium, acide salicylique, sulfate de cuivre). Ils sont ensuite mélangés dans un mortier en porcelaine dans lequel il est ajouté une solution de formaldéhyde. Triturer avec la glycérine puis ajouter l'eau par petites quantités. Ajouter ensuite goutte à goutte les huiles essentielles mentionnées tout en mélangeant jusqu'à obtention d'un mélange homogène. Pour avoir une meilleure consistance des pâtes, il a été pris différentes quantités de glycérol et d'eau. Différents essais ont été réalisés pour déterminer les quantités nécessaires des ingrédients à ajouter (**tableau 8,9**).

Tableau 8: Essais de préparation d'une pâte à base de l'HE de *Thymus fontanesii*

Constituants	Essai 1 en g	Essai 2. en g	Essai 3. en g	Essai 4 en g.
Glycérol	20	17	14	12
H ₂ O	2	4	6	8
Bentonite	30	30	30	30
ZnO	25	25	25	25
Acide salicylique	3	3	3	3
Tetraborate de Na	5	5	5	5
Formaldéhyde	x	x	x	x
CuSO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5
HE de <i>Mentha crispa</i>	x	x	x	x
HE de <i>T.fontanesii</i>	x	x	x	x

Tableau 9: Essais de préparation d'une pâte à base de thymol extrait

Constituants	Essai 1 en g	Essai 2. en g	Essai 3. en g	Essai 4 en g.
Glycérol	20	17	14	12
H ₂ O	2	4	6	8
Bentonite	30	30	30	30
ZnO	25	25	25	25
Acide salicylique	3	3	3	3
Tetraborate de Na	5	5	5	5
Formaldéhyde	x	x	x	x
CuSO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5
HE de <i>Mentha crispa</i>	x	x	x	x
Thymol extrait	x	x	x	x

Mettre chaque pâte dans un récipient hermétique et conserver ces derniers dans un endroit frais.

IV.9 Contrôles du produit fini

IV.9.1 Examen des caractéristiques macroscopiques

L'examen des caractéristiques macroscopiques constitue la première approche de la qualité de la préparation et doit faire l'objet d'une étude approfondie de la part du fabricant, afin

de lui permettre l'observation de toute anomalie. En effet, des modifications perçues au niveau des caractéristiques visuelles, olfactives, sont des indicateurs possibles d'une dégradation de causes diverses (oxydations, variation de pH).

IV.9.2 Test de tolérance [126]

L'application, sur la peau saine ou lésée, de produits chimiques, est susceptible de provoquer chez certains sujets des irritations d'intensité variable. Les tests de tolérance locale cutanée ont pour but de prédire, à partir de la connaissance de la toxicité sur un organisme animal vivant, le risque toxicologique chez l'homme.

Principe [126]

L'indice d'irritation primaire cutanée de nos produits a été déterminé chez le lapin selon la méthode de référence publiée au Journal Officiel de la République Française du 21 février 1982. Le dos de chaque animal est divisé en deux zones après élimination des poils. Sur l'une des zones, le produit est appliqué directement, sur l'autre zone, il est appliqué après scarification. Le produit est maintenu en contact avec la peau par un pansement pendant 24 heures. Des lectures sont faites une heure après enlèvement du pansement, et 24 à 72 heures après l'application du produit. Les lectures consistent à apprécier l'érythème et l'œdème selon une échelle numérique notée de 0 à 4. La détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée IP se fait par l'addition des chiffres obtenus pour l'érythème et l'œdème à chaque temps de lecture (24 et 72 heures après l'application) et pour chacune des zones. Les chiffres ainsi obtenus sont additionnés, ce total est divisé par 24, la moyenne ainsi obtenue représente l'IP, celui-ci permet de classer le produit en quatre types de réponses :

- Action non irritante, IP inférieur à 0.5: **IP < 0.5**;
- Action légèrement irritante, IP compris entre 0.5 et 2: **0.5 < IP < 2**;
- Action moyennement irritante, IP compris entre 2 et 5: **2 < IP < 5**;
- Action sévèrement irritante, IP compris entre 5 et 8: **5 < IP < 8**.

Protocole expérimental

En premier lieu, le dos et les flancs de 6 lapins ont été tondu puis 3 scarifications parallèles de l'épiderme de 3cm de long espacées d'environ 0.5 cm ont été pratiquées au niveau du flanc droit de chaque animal. Vingt-quatre heures plus tard, une quantité de produit équivalente à 0,5 g a été appliquée sur chacun des flancs des animaux sous pansement semi-occlusif. Chaque produit formulé a été laissé en contact avec la peau durant 24 heures (**Fig.22**).

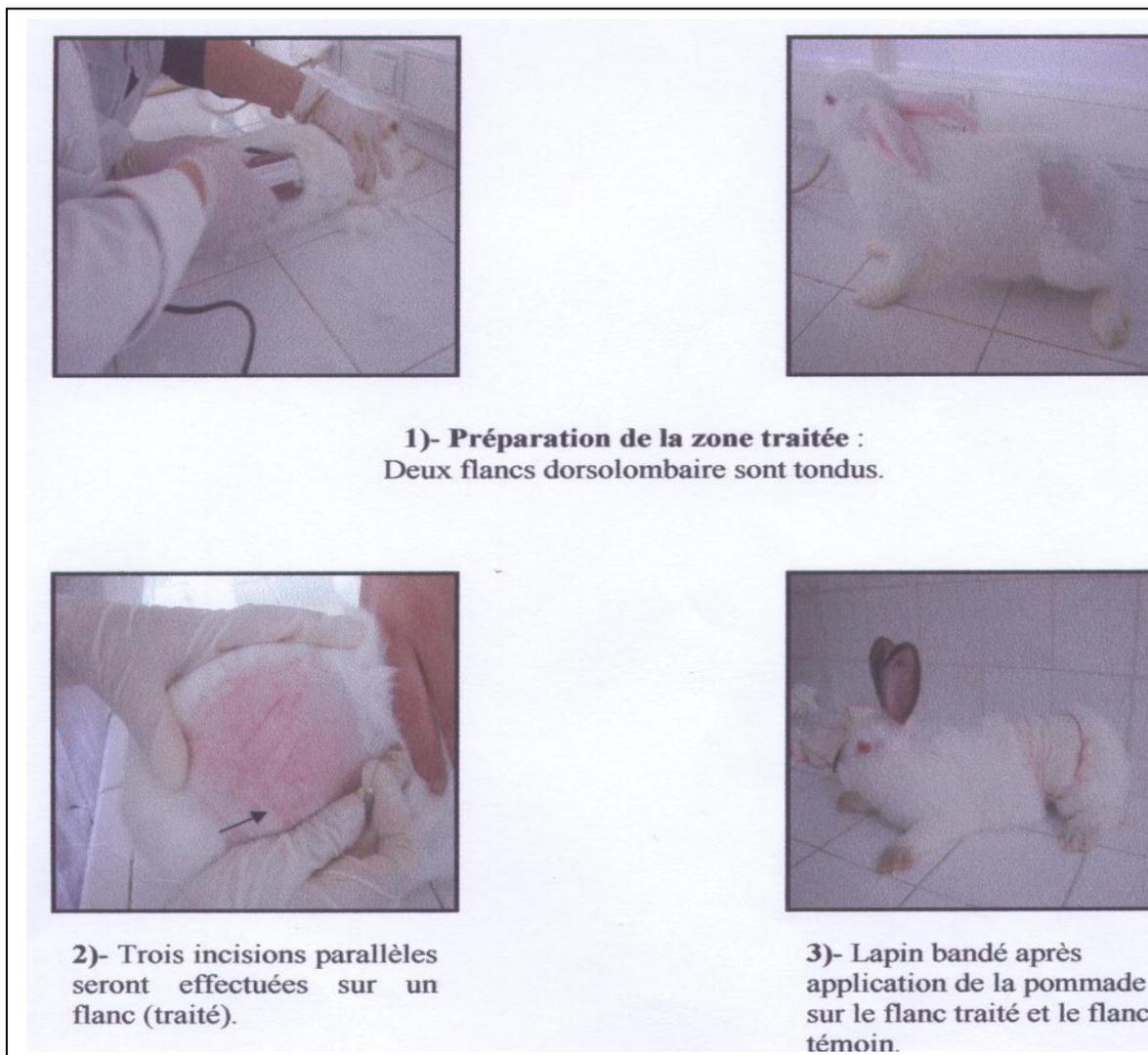


Fig. 22: Technique de scarification, rasage et bandage des lapins.

Trente minutes après l'enlèvement du pansement et 48 heures plus tard (soit environ 24 et 72 heures après l'application), l'irritation cutanée a été appréciée aux sites d'application (scarifié et non scarifié) à l'aide d'une échelle d'évaluation numérique permettant de coter les érythèmes et la formation d'œdème.

L'évaluation porte sur la formation de l'érythème et de l'œdème qui sont notés suivant une échelle numérique :

Tableau 10 : Evaluation de l'œdème

Absence d'œdème	0
œdème très léger (à peine visible)	1
léger œdème (gonflement apparent)	2
œdème moyen (épaisseur 1mm)	3
œdème grave (épaisseur supérieur à 1mm)	4

Tableau 11 : Erythème et formation d'escarres :

Absence d'érythème	0
léger érythème (à peine visible)	1
érythème bien visible	2
érythème modéré à important	3
érythème grave (rouge pourpre)	4

L'indice d'irritation primaire cutanée a été déterminé en additionnant les chiffres obtenus pour l'érythème et l'œdème, à 24 et 72 heures, sur les 12 zones d'application (1 zone scarifiée + 1 zone intacte) x 6 animaux puis en divisant le total par 24.

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

Avec :

Avec : 24 = nombre de lapin (6) × nombres de zones testés (traité et témoin = 2) × nombre de type d'irritation (œdème et érythème = 2)

IV.10 Tests microbiologiques

Les tests microbiologiques ont été réalisés au laboratoire de microbiologie du **C.R.D – SAIDAL** (El-Harrach, Alger) et au **Laboratoire National de Contrôle de Produits Pharmaceutiques- Alger (LNCPP)**.

IV.10.1 Évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne

La technique que nous avons utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne de nos produits (HE, thymol extrait, pâte à base de l'HE, et d'autre à base de thymol extrait) est

l'aromatogramme ou la méthode de diffusion en milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose (ANNEXE4).

Cette méthode utilisée par certains auteurs [23,25,53,128] est la technique que nous avons utilisée pour évaluer l'activité inhibitrice de nos produits (HE de *Thymus fontanesii*, de thymol extrait et des pâtes préparées).

Protocole expérimental

a- Pour les bactéries et les levures [129]

L'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de nos produits, consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes (bactéries et levures) en contact de différents produits, et ceci par la méthode de diffusion sur plaque de gélose (diffusion sur milieu gélosé) en utilisant des disques de cellulose préalablement stérilisés par lumière UV de 6mm de diamètre. En ce qui concerne les formes semi-solide (pâtes formulées, mycotine et mycocide), un volume de 0.1 mm³ est déposé au centre de chaque boîte à l'aide d'une seringue stérile.

Préparation de l'inoculum

La méthode de préparation des inoculums est celle préconisée par la SFM (communiqué de 2005) qui consiste à préparer, à partir d'une culture de 18-24h pour les bactéries et de 48h pour les levures sur le milieu gélosé, une suspension en solution saline d'eau physiologique stérile (0.9% NaCl) à une concentration de 10⁷ à 10⁸ germes/ml. Cette suspension obtenue par la détermination de la transmittance allant de 22% à 32% pour les bactéries et entre 2% et 3% pour les levures et cela à une longueur d'onde de 620nm (standardisation de l'antibiogramme selon l'OMS, 1999).

Diffusion sur milieu gélosé

La méthode de diffusion sur milieu gélosé a été réalisée sur le milieu Muller-Hinton (M-H) (pour les bactéries) et Sabouraud (pour les levures). On fait fondre les deux milieux dans un bain marie à 95°C, puis on verse simultanément et aseptiquement une première couche de chaque milieu dans une boîte de Pétri à raison de 15 ml par boîte avec 3 répétitions par souche. Après refroidissement à température ambiante, onensemence 200 µl de suspension de chaque souche par la méthode du Râteaux et on laisse solidifier sur la paillasse. A l'aide d'une pince stérile, on prélève un disque de cellulose préalablement stérilisé par lumière UV de 6mm de diamètre, et on l'imbibe d'huile essentielle pure et de

solution alcoolique de thymol, On dépose le disque sur la surface gélosée sèche des boîtes de Pétri. En ce qui concerne les pâtes formulées et les pommades mycotine et mycocide, un volume de 0.1 mm^3 est déposé au centre de chaque boîte à l'aide d'une seringue stérile. Puis nous laissons les boîtes durant 20 minutes à la température ambiante pour permettre la diffusion de l'échantillon. Elles sont ensuite mises à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les levures.

b- Pour les dermatophytes [2,130,131]

L'évaluation qualitative de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de la pâte formulée à base d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* en comparaison avec celle de la pommade commercialisée (Terbinafine), consiste à estimer l'inhibition de la croissance des dermatophytes soumis au contact de nos produits, et ceci par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

Préparation de l'inoculum

Les inoculums ont été préparés à partir de cultures de sept à quatorze jours sur milieu de Borelli. La partie aérienne de chaque culture est raclée à l'aide d'une pipette Pasteur et suspendue dans une solution saline stérile. Les suspensions obtenues sont quantifiées à la cellule de Malassez jusqu'à l'obtention d'une densité entre 5×10^5 et 5×10^6 spores/ml pour chacune des souches testées.

Diffusion sur milieu gélosé

La méthode de diffusion sur milieu gélosé a été réalisée sur le milieu Sabouraud dextrose agar (SDA). On fait fondre ce milieu dans un bain-marie à 95°C , puis on en verse aseptiquement une quantité définie (20 ml) dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Après refroidissement à température ambiante, onensemence 300 μl de suspension de chaque souche par la méthode du Râteaux. A l'aide d'une pince stérile, on prélève un disque de cellulose préalablement stérilisé par lumière UV de 6mm de diamètre, et on l'imbibe d'huile essentielle pure, un seul disque est déposé au centre de chaque boîte. En ce qui concerne la pâte formulée et la pommade de terbinafine, un volume de 0.1 mm^3 est déposé au centre de chaque boîte à l'aide d'une seringue sans aiguille. Chaque produit a été testé sur 3 boîtesensemencées de la première souche fongique et 3 autres boîtes pour la seconde. Une boîte pour laquelle le disque est imbibé d'eau distillée est utilisée comme témoin.

Après 5-7 jours d'incubation à 26°C, Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique est calculé par la formule suivante : [95]

$$\% \text{ Inhibition} = (D_{\text{test}} / D_{\text{boite de pétri}}) \times 100 \quad [95]$$

D_{test} : diamètre de la zone d'inhibition.

D_{control} : diamètre de la boite de pétri.

IV.10.2 Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle : *Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI et la concentration minimale bactéricide CMB fongicide CMF*

a- Pour les bactéries et les levures [132]

L'évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice CMI et la concentration minimale bactéricide CMB et fongicide CMF sur des microorganismes (bactéries et levures) soumis aux contact des huiles essentielles de thym, et ceci par la méthode de dilution en milieu solide en utilisant des disques absorbants pour les bactéries et les levures. La méthode utilisée est celle de la dilution en milieu solide.

Préparation d'inoculum

Par la même manière de diffusion sur milieu gélosé, on prépare l'inoculum pour cette méthode. La suspension est reprise par dilutions successives dans le tampon phosphate salin (PBS) pour l'obtention d'une densité initiale de l'inoculum entre 10^5 CFU (unités formant colonies)/mL et 10^6 CFU/mL pour chacune des souches testées.

Préparation de l'émulsion d'HE

La solution mère d'huile essentielle doit être au **0.2/10 (2%)**. Elle a été préparée dans M-H (pour les bactéries) et SAB (pour les levures) additionnés de tween 80 et maintenu en surfusion. Une série de dilution de chaque produit est préparée à des concentrations allant de 2% à 0.03% pour l'HE. La réalisation des dilutions se fait comme suite :

1 ml d'HE est dilué dans 50 ml de milieu M-H (bactéries) ou SAB (levures), maintenu en surfusion, dans un premier flacon ce qui donne une dilution de 2% (solution mère) ;

verser la moitié du premier flacon dans un deuxième flacon et ajuster avec 25 ml de milieu pour la dilution 1% procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0.03%. Les mélanges de chaque dilution sont immédiatement repartis dans deux boîtes de Pétri rondes (90 mm de diamètre) à raison de 12.5 ml de milieu par boîte. La gamme de concentration finales ainsi obtenue correspond à 2% ; 1% ; 0.5% ; 0.25% ; 0.125% ; 0.06% ; 0.03%.

Dépôt des disques

Après solidification, les disques stériles en cellulose de 0.6 cm imbibés de la suspension bactérienne ou fongique (levures) sont déposés à la surface du milieu gélosé contenant ou pas l'HE. Chacune des boîtes a étéensemencée par deux à trois (2-3) espèces différentes. Tous les essais sont réalisés deux fois Les boîtes de Pétri (témoins et essais) sont mises en incubation pendant 24 heures à 37°C pour les bactéries et pendant 72 heures à 25°C pour les levures. La lecture des résultats se fait visuellement par l'observation de la croissance ou de l'inhibition de la croissance du microorganisme antimicrobien testé par rapport à la croissance sur une boîte témoin sans extrait. La CMI est définie comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Pour les boîtes qui ne présentent pas de croissance, le disque de mycélium est transféré sur un milieu gélosé M-H (bactérie) et SAB (levure) neuf pour confirmer s'il s'agit d'un effet fongistatique ou fongicide sur les levures et d'un effet bactériostatique ou bactéricide sur les bactéries. la CMB et la CMF ont été définies comme étant les plus faibles concentrations de l'agent pour lesquelles il y a absence totale de colonies en comparaison avec les témoins après 24H de culture à 37°C pour les bactéries et 72 H d'incubation à 25°C pour les levures.

b- Pour les dermatophytes [2,130,131]

L'évaluation quantitative de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, consiste à déterminer la CMI (Concentration minimale inhibitrice) et la CMF (Concentration minimale fongicide) de celle-ci sur les deux souches testées. Pour cela, deux méthodes de macrodilution différentes ont été utilisées ; l'une en milieu solide et l'autre en milieu liquide.

Préparation de l'inoculum

Les inoculums ont été préparés à partir de cultures de sept à quatorze jours sur milieu de Borelli. La partie aérienne de chaque culture est suspendue dans une solution

saline stérile. Les suspensions obtenues sont quantifiées à la cellule de Malassez jusqu'à l'obtention d'une densité entre 5×10^5 et 5×10^6 spores/ml pour chacune des souches testées.

Préparation de l'émulsion d'HE

Les huiles essentielles ont été utilisées sous forme d'émulsions pour pouvoir être manipulées comme des solutions. Une solution stérile d'agar-agar à 0,2 % a été choisie comme agent émulsionnant du fait qu'elle soit dépourvue de toute influence sur l'activité des huiles essentielles. A partir d'une solution mère d'huile essentielle diluée au 1/10, une série de dilutions allant de 20% (V/V) à 0.01% sériées à raison de 2 et préparées extemporanément avec une solution d'agar-agar à 0.2%.

Méthode de macrodilution en milieu solide [2,130,131]

À partir de tubes contenant des concentrations différentes d'huile essentielle, nous prélevons 2 mL que l'on rajoute aseptiquement à 18 mL du milieu Sabouraud dextrose agar (SDA) préalablement fondu et refroidi à la température de 45°C. Les tubes sont agités manuellement puis le contenu est coulé dans des boîtes de Pétri. Une boîte de pétri contenant 20 ml du milieu SDA sans HE est utilisée comme témoin. Les concentrations d'huile essentielle (V/V) obtenues avant et après mélange avec le milieu SDA sont résumées dans le tableau 12.

Tableau 12 : Concentrations en huile essentielle (% V/V) obtenue avant et après mélange avec le milieu SDA

Numéro du tube	Concentration en HE avant mélange avec le milieu SDA (% V/V)	Concentration en HE après mélange avec le milieu SDA (% V/V)
1	20	2
2	10	1
3	5	0.5
4	2.5	0.25
5	1.25	0.125
6	0.62	0.062
7	0.31	0.031
8	0.15	0.015
9	0.05	0.005
10	0.025	0.0025
11	0.01	0.001

L'inoculation des souches fongiques a été faite par deux méthodes :

Inoculation par la méthode des puits [2,131]

À l'aide d'une pipette Pasteur préalablement chauffée, on réalise des puits à la surface du milieu gélosé contenant ou pas l'HE. 50 µl de la suspension fongique de chaque souche est déposée aseptiquement dans ces puits. Les boîtes de Pétri (témoins et essais) sont mises en incubation pendant 5-7 jours à 26°C. La CMI est définie comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

Inoculation par la méthode des disques [2,130,131]

Des disques stériles de cellulose de 0.6 cm de diamètre imbibés de la suspension fongique sont déposés à la surface du milieu gélosé contenant ou pas l'HE. Les boîtes de Pétri (témoins et essais) sont mises en incubation pendant 5-7 jours à 26°C. La CMI est définie comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

Au 7^{ème} jour, les disques des boites ne présentant pas de croissance visible sont transférés dans un milieu gélosé (SDA) neuf pour confirmer s'il s'agit d'un effet fongistatique ou fongicide sur les dermatophytes testés. La CMF est définie comme étant la plus faible concentration du produit pour laquelle il y a absence totale de colonies après 5-7 jours de culture à 26°C.

Méthode de macrodilution en milieu liquide [2,130,131]

Les mêmes dilutions préparées pour la méthode en milieu solide sont ajoutées à raison de 0,5 mL dans des tubes contenant 4 mL du milieu Sabouraud dextrose liquide (SDL) préalablementensemencé avec 0,5 mL de la suspension fongique.

Après une durée d'incubation de 5-7 jours à 26°C, la lecture des résultats a permis de déterminer la CMI pour laquelle on n'observe pas de pousse visible à l'œil nu (trouble).

Au 7^{ème} jour d'incubation, une goutte de chaque tube ne présentant pas de pousse visible est réensemencée dans un bouillon vierge de SDL et parallèlement sur une gélose de SDA. La CMF est définie comme étant la plus faible concentration du produit pour laquelle il y a absence totale de colonies après 5-7 jours d'incubation à 26°C.

CHAPITRE V

CHAPITRE V

Résultats et Discussions

RESULTATS ET DISCUSSIONS

V.1 Extraction des huiles essentielles

V.1.1 Résultats d'extraction par hydrodistillation

Le rendement en huile essentielle est exprimé par la quantité d'huile (en ml) obtenue pour 100g de matière végétale sèche.

V.1.1.1 Influence du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle du *Thymus fontanesii*

La cinétique de l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle du thym a été effectuée à différentes périodes de récolte. La détermination de l'évolution du rendement de l'huile essentielle du thym en fonction du temps est illustrée dans la **Fig.23**.

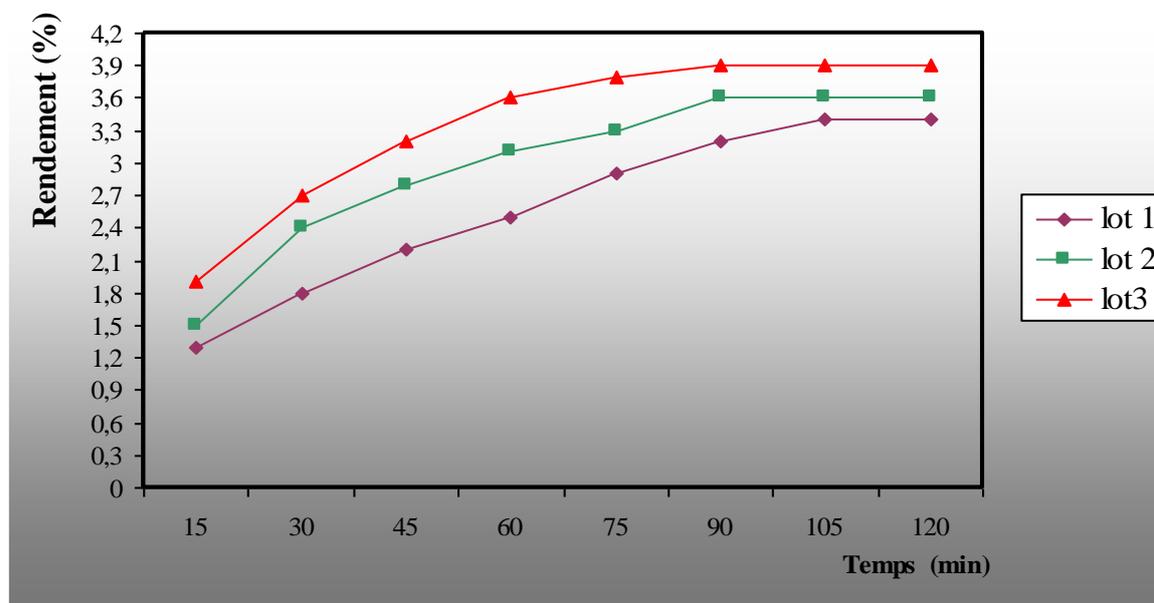


Fig. 23 : Cinétique d'hydrodistillation de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii* à différentes périodes de récolte

En se basant sur la Fig.23, il est constaté que l'allure générale des trois courbes est croissante et qu'elle tend vers un palier au bout de 90 minutes.

En effet, le rendement augmente rapidement durant les soixante premières minutes où plus de 92%, 86% et 85% de l'huile sont extraites respectivement pour le lot 3, 2 et 1, son évolution devient plus lente par la suite pour atteindre un rendement égal à 3,4%, 3,6%, 3,9% respectivement pour le thym récolté au mois de mars, mai et juillet après 90 minutes d'extraction et au-delà de quatre-vingt-dix minutes, un palier qui souligne un décroissement de la vitesse d'extraction remarqué.

La **Fig. 24** présente en histogramme montrant la variation de la teneur relative de l'huile essentielle en fonction de la date de cueillette du thym.

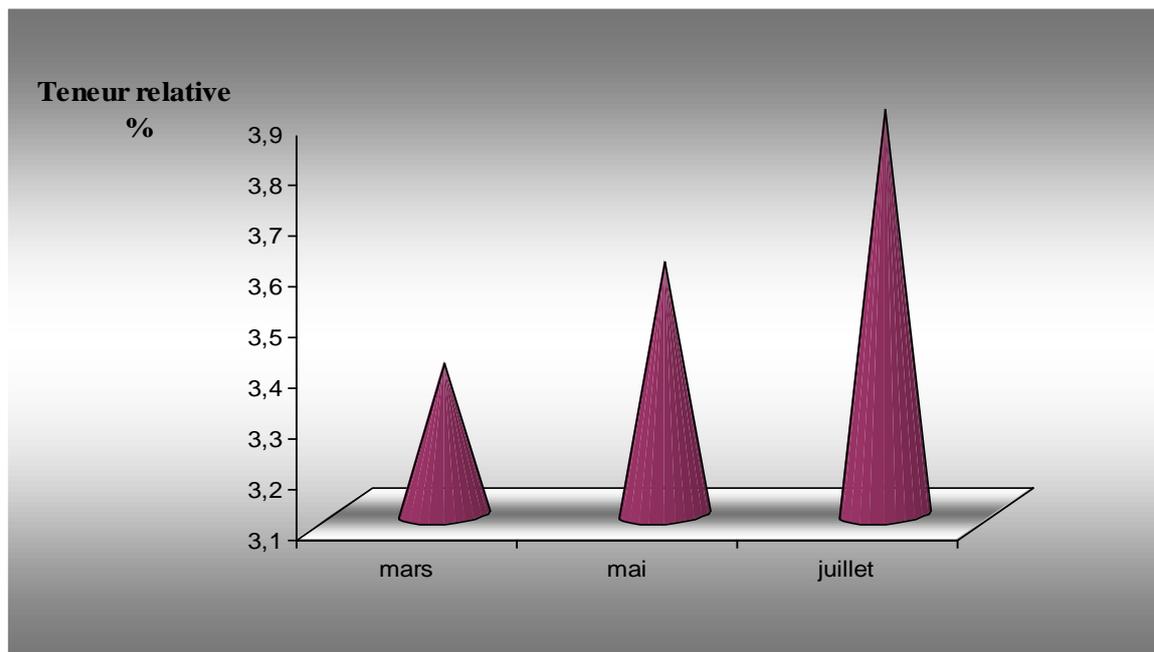


Fig.24 : Variation des teneurs relatives de l'huile essentielle en fonction de la date de cueillette du *Thymus Fontanes*

Il est observé des rendements d'extraction variant considérablement suivant les différents échantillons. Il faut noter que les meilleurs rendements sont obtenus durant la période de floraison (mai – juillet). Le rendement le plus élevé en feuilles est obtenu à la récolte au mois de juillet avec 3.9%. Les récoltes précoces du mois de mars sont caractérisées par de faibles rendements en feuilles (3.4%) par rapport aux autres récoltes, dont les rendements sont dus au fait que la culture n'ait pas suffisamment accompli son cycle pour extérioriser son potentiel. (Ceci peut être attribué à la sénescence des feuilles récoltées au mois de mars correspondant à la période végétative début floraison).

Les vitesses instantanées d'extraction de l'huile essentielle du thym sont calculées à partir des rendements instantanés en huile essentielle notés toutes les 15 minutes. La **Fig. 25** illustre une forte diminution de la vitesse durant les 60 premières minutes, ce qui se traduit par un entraînement massif de l'huile essentielle où, plus de 92%, 86% et 85% de l'huile sont récupérées respectivement pour le lot 3, lot 2 et lot 1. Puis à partir de 90min on remarque un affaiblissement de la vitesse, cela signifie qu'il n'y a plus d'huile à extraire et que l'on peut arrêter l'extraction.

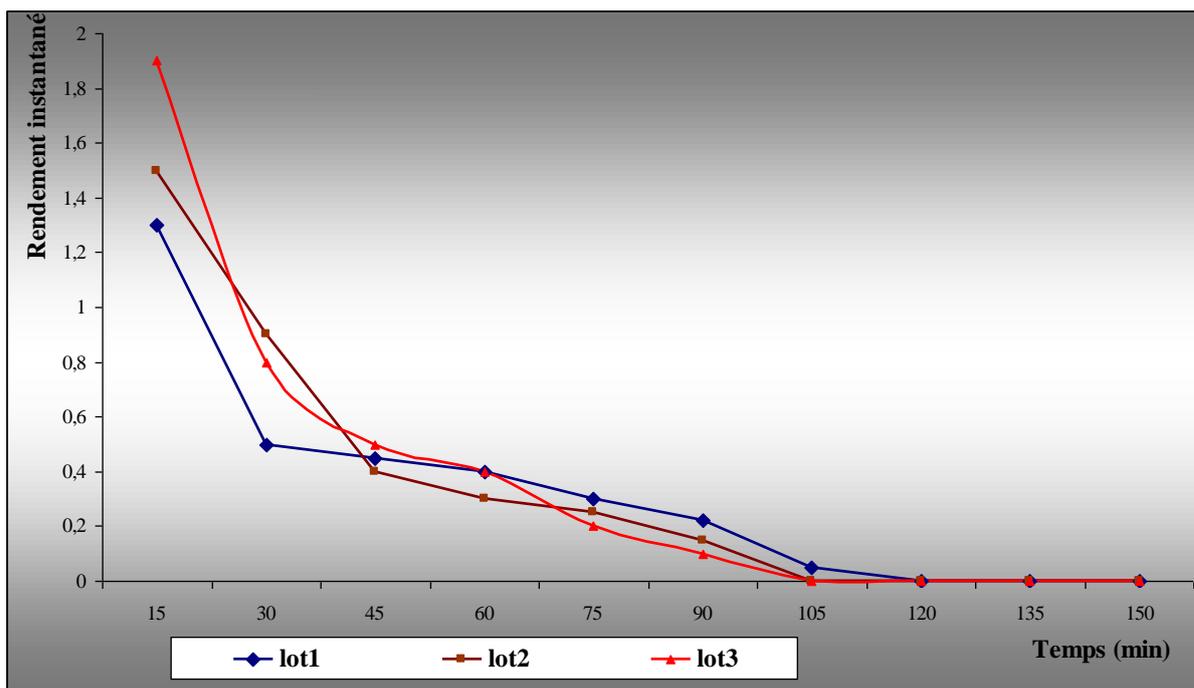


Fig.25 : Evolution de la vitesse d'extraction en fonction de la durée d'extraction de l'HE du thym.

De ce fait il faut dire que le plus fort taux de l'huile essentielle est extrait lors des 90 premières minutes de traitement, et il ne serait économiquement pas avantageux de prolonger l'extraction au-delà d'une heure et demie. Ceci pour éviter également la naissance des réactions secondaires (hydrolyse, isomérisation etc..).

V.1.1.2 Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

L'identification des composants de l'huile essentielle réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (CPG-SM). Les résultats de notre étude sur la composition chimique de l'huile essentielle en fonction de la date de cueillette apparaissent au **tableau 13 (voir chromatogrammes 1,2,3 ANNEXE 3)** et aux **Fig. 26,27**. Le tableau 14 rassemble les données expérimentales à savoir le temps de rétention, les noms et les pourcentages ($\geq 0.01\%$), des différents composants identifiés.

Tableau 13 : Composition relative de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Composants	Temps de rétention	Lot 1 (%)	Lot 2 (%)	Lot 3 (%)
Ocimene	5.17	-	0.279	-
Gamma-terpinene	5.46	1.173	20.85	7.376
Z-beta -terpineol	5.57	-	-	0.276
Terpinolene	5.99	-	0.279	0.284
Linalool	6.34	4.86	5.669	6.079
Trans pinocarveol	6.96	-	-	0.524
Bornéol	7.58	-	0.529	1.085
4-terpineol	7.83	-	1.211	2.291
Alpha-terpineol	8.68	-	-	0.416
Trans-dihydrocarvone	8.86	-	0.187	0.292
Carvone	9.01	-	-	0.129
Thymol-methyl-ether	9.14	-	0.197	0.082
Thymoquinone	9.84	-	-	0.303
P-Cymène	10.10	-	0.712	0.889
Thymol	10.63	77.723	33.60	63.456
Carvacrol	10.69	13.278	27.173	-
Copaene	11.57	-	0.265	-
Beta-bourbonene	11.60	-	0.156	0.274
Alpha-gurjunene	12.01	0.930	-	-
Cyperene	12.13	-	1.122	0.725
Beta-caryophyllene	12.31	2.033	2.348	2.168
Allo-aromadendrene	12.63	-	0.358	0.130
4-tert-butylcatechol	12.77	-	0.700	2.392
Ledene	13.54	-	0.513	0.494
Beta-bisabolene	13.76	-	0.650	0.300
Gamma-cadinene	13.85	-	0.328	0.277
Beta-cadinene	13.99	-	0.725	0.574
Delta-cadinene	14.31	-	0.263	0.206
Phenol,4-methoxy2,3,6-trimethyl	14.53	-	0.121	1.142
	14.89	-	0.504	1.292

Spathulenol	15.78	-	0.163	0.390
Tau-cadinol	16.04	-	-	0.296
Juniper camphor	19.35	-	0.333	0.087
Naphtalene	22.17	-	0.207	0.982
Tertinoïn				
Total		99.997%	99.442%	95.211%

- : composé non identifié

Il apparaît ainsi une influence du cycle végétatif, non seulement sur le rendement en HE, mais aussi sur le profil chimique de celle-ci. L'analyse des trois échantillons par CPG/SM a permis d'identifier 27 composés représentant 99.442% et 30 composés représentant 95.211% de la composition chimique globale de l'HE de l'échantillon (2) et (3) rassemblés au mois de mai et juillet et qui correspondent respectivement à la période de pleine floraison et de fin floraison. Tandis que ceux rassemblés au mois de mars pendant l'étape végétative début floraison, nous ont permis d'identifier 6 composés représentant 99.997% de l'HE totale (**tableau 13**).

Le thymol (33.6-77.72%) est toujours le composé majoritaire. Son isomère, le carvacrol, a été présenté avec une teneur appréciable 13,27% et 27,17% respectivement dans l'HE (1) et (2) mais n'a pas été identifié dans l'HE (3). Mise à part ce phénol monoterpénique, nous retrouvons globalement les mêmes constituants majoritaires dans l'échantillons (2) et (3) mais avec des teneurs différentes: le γ -terpinène (7.37-20,85%), le linalool (5.66-6.08%), le bornéol (0.52-1.085%), le 4-terpineol (1.21-2.29%), p-cymène (0.71-0.889%). L'échantillon (2), possède une composition riche en γ -Terpinène (20,85%) contre seulement 1.173% dans (1).

La variation des composés sésquiterpéniques démontre bien l'importance du β -Caryophyllène (2.03-2.348%). le α -gurjunène (0.93%) est présent avec une teneur appréciable dans l'échantillon (1). Par contre, le β -Cadinène (0.725%) et cyperène (1.12%) sont plus importants dans l'échantillon (2), tandis que le 4-tert-butylcatechol (2.392%) est plus important dans l'échantillon (3) (**Fig. 26**).

Donc, il faut noter que l'huile essentielle de notre espèce de thym à chémotype thymol.

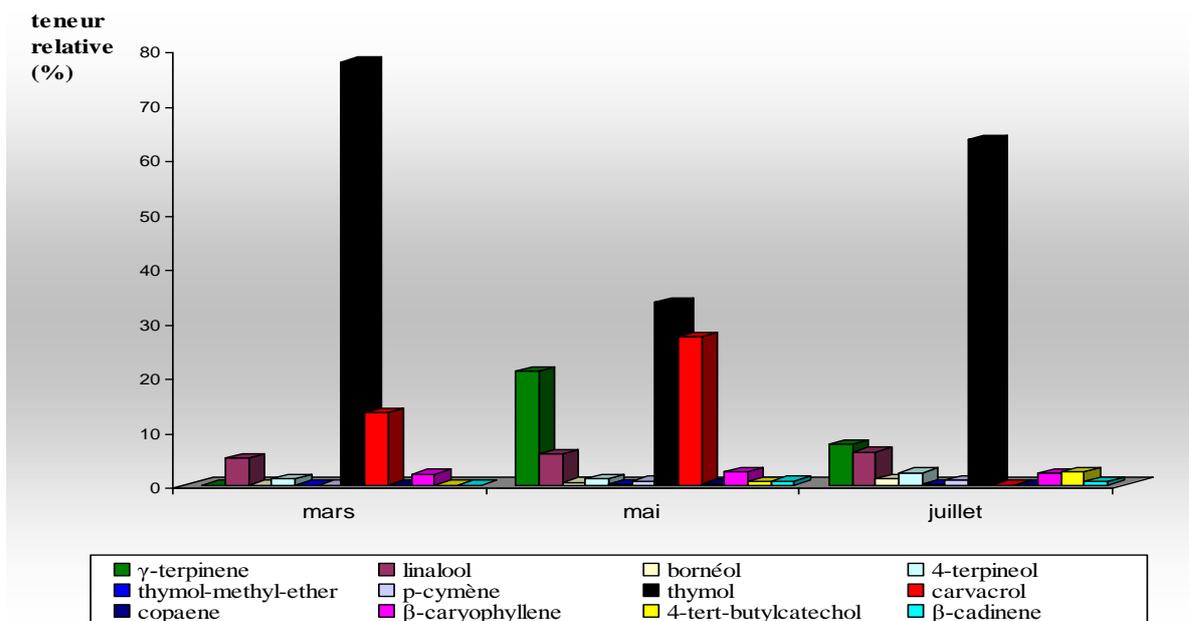


Fig. 26 : Evolution temporelle de la proportion des composés majoritaires de l'huile essentielle en fonction de la date de cueillette du *Thymus fontanesii*

Il faut noter une forte prédominance de la fraction monoterpénique (le thymol, le carvacrol, le γ -terpinène, le linalool, le bornéol, le 4-terpineol, p-cymène, etc...) par rapport à la fraction sesquiterpénique (β -Caryophyllène, le α -gurjunène, le β -Cadinène, cyperène, le 4-tert-butylcatechol, etc...).

La **Fig.27** présente en histogramme la variation de la composition chimique par famille de composés.

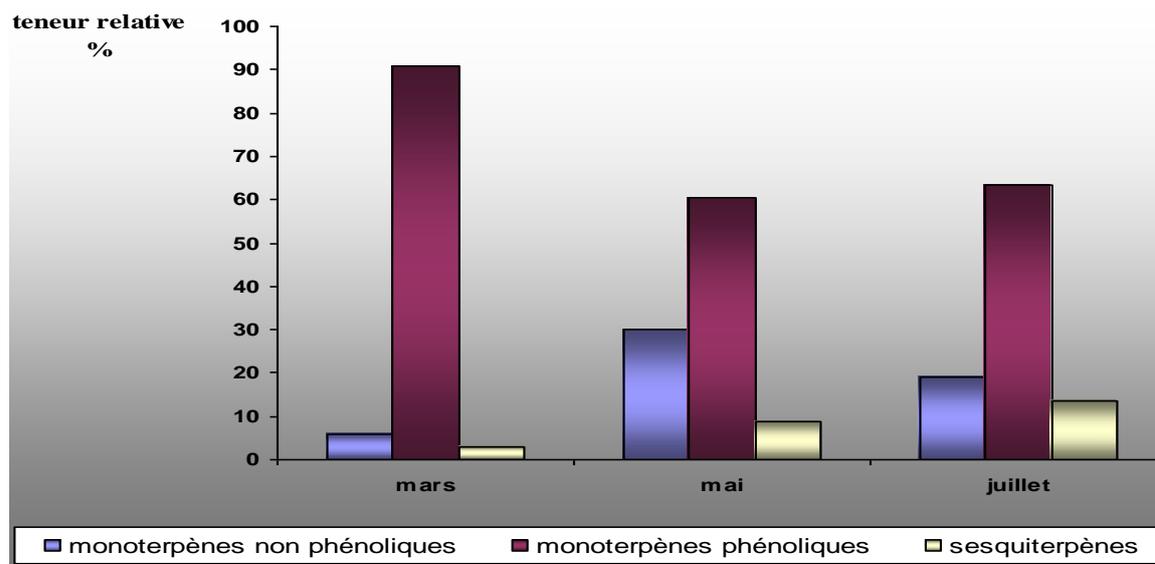


Fig.27 : Variation des teneurs relatives des principales classes chimiques de l'huile essentielle en fonction de la date de cueillette de *Thymus fontanesii*

D'après la **Fig.27** il est constaté que la fraction monoterpénique est ultra majoritaire dans les trois échantillons. Parmi ces monoterpènes, il est remarqué que celles phénoliques (thymol, carvacrol) sont les constituants prédominants durant les trois périodes de récolte, représentant plus de 91% du mélange dans l'HE (1), elle est en effet nettement plus importante par rapport à celle extraite en mai et en juillet (respectivement 60.77% et 63.45%). Tandis que celles non phénoliques représentent plus de 29.90% de la composition d'HE (2) et 20.026% dans l'échantillon (3). Par contre, dans celle extraite en mars ne représente que 6.033%.

Dans l'échantillon (2) et (3), la fraction sesquiterpénique est constituée par une vingtaine de composés (β -Caryophyllene, le α -gurjunene, le β -Cadinene, cyperene, le 4-tert-butylcatechol, par exemple), mais représente moins de 12% environ de la composition de l'HE (2) et (3). Il est noté également la présence de certains composés sesquiterpéniques en faible proportion dans l'échantillon (1) où la fraction sesquiterpénique représente moins de 3% du mélange.

Nous avons comparé la composition chimique de notre huile essentielle récoltée au mois de mars avec celle de *Thymus fontanesii* provenant d'autres régions d'Algérie extraite par hydrodistillation. La comparaison a porté sur la teneur en composés majoritaires (**tableau 14**).

Tableau 14 : Comparaison des teneurs relatives de quelques composés de l'huile essentielle du genre *Thymus fontanesii*.

Composés/régions	Teneurs relatives (%)	Teneurs relatives (%)	Teneurs relatifs (%)
	1	2	3
Thymol	29.3	67.8	77.72
carvacrol	-	-	13.27
γ -terpinene	21.7	15.9	1.173
p-cymene	15.9	13	-
linalool	4.8	-	4.86
β -Caryophyllene	2.9	-	2.033

1 : *Thymus fontanesii* de la région de Djelfa [133] ;

2 : *Thymus fontanesii* de la région de Sétif [134] ;

3 : *Thymus fontanesii* de la région de Lakdharia (échantillon étudié).

Il faut noter une forte prédominance de la fraction monoterpénique (Thymol, carvacrol, γ -terpinene, p-cymene, linalool) par rapport à la fraction sesquiterpénique (β -Caryophyllene ...) dans tous les échantillons présentés dans le tableau 14.

Si l'on compare maintenant, la composition chimique de notre échantillon à celles décrites par **Dob et al. [133]** et par **Ghannadi et coll [134]** pour deux huiles essentielles de *Thymus fontanesii* originaires de l'Algérie, on constate que le thymol reste toujours le constituant principal de l'huile essentielle mais à une plus forte proportion (77.72% contre 29.3 et 67.8%). Cependant, il existe une différence importante en ce qui concerne certains composés. En effet, le carvacrol (13.27%), qui a été identifié dans notre échantillon, n'est pas décrit dans les échantillons précédents. Par ailleurs, ces deux échantillons présentent des teneurs appréciables en γ -terpinene (15.9-21.7%) et p-cymène (13-15.9%), ce dernier n'a pas été identifié dans notre huile essentielle, tandis que le linalool et le β -caryophyllene sont présents à des teneurs comparables à celles de l'échantillon (1). On serait donc en présence de trois compositions chimiques relativement différentes résultant de différents facteurs intervenant lors de la culture de la plante notamment les facteurs climatiques (chaleur, froid, stress hydrique...) [135].

Les résultats de cette étude ont montré que l'huile essentielle extraite à partir des échantillons collectés à Lakhdaria, est relativement plus riche en composés phénoliques, et plus active que celles des autres provenances.

V.1.1.3 Caractères organoleptiques et indices physico-chimiques

L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* obtenue par hydrodistillation a l'aspect d'un liquide visqueux, limpide de couleur variant du jaunâtre au rougeâtre selon la période de récolte. La couleur est fortement influencée par le mélange complexe de composés volatils [139]. Son odeur caractéristique est agréablement parfumée de thymol.

Les moyennes des autres paramètres mesurés sont reprises dans le tableau 15 ci-dessous et comparées à des références données par les normes AFNOR [17].

Tableau 15 : Indices physico-chimiques de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Critères	Echantillons	Référence (AFNOR, 1996)	Conformité
Densité relative à 20°C	0.925	0.915-0.935	Oui
Indice de réfraction à 20°C IR	1.5015	1.4900-1.5040	Oui
Pouvoir rotatoire à 20°C PR	0°	-3°-0°	Oui
Indice d'acide IA	4.2	4.1-5.1	Oui
Indice d'ester IE	51.825	49.5-52.55	Oui

Les résultats indiquent que les paramètres physico-chimiques des échantillons analysés se retrouvent dans les fourchettes de références établies par les normes. Les paramètres physico-chimiques diffèrent suivant l'origine de l'huile essentielle de thym. Ainsi, une huile de France n'aura pas les mêmes valeurs de paramètres qu'une huile d'Algérie, du Turque, de l'Espagne, ... Les valeurs données dans le tableau 16, sont celles concernant explicitement le *Thymus fontanesii* de Lakhdaria. Tous ces paramètres étant influencés par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les conditions de cultures des plantes, il est logique que leurs valeurs diffèrent d'un endroit à l'autre du globe [140]. Cela fait partie de la complexité de la notion de chémotype.

V.1.1.4 Discussion

Les variations du rendement et de la composition chimique de l'HE de thym ont été aussi étudiées puis publiées par de nombreux auteurs s'accordant ou non sur les résultats obtenus.

Les résultats obtenus montrent que le meilleur rendement en HE de *Thymus fontanesii* a été obtenu à la fin de la floraison (juillet- août) de la plante. Ces résultats corroborent ceux de **Hudaib et coll (2002) [136]** qui trouvent que le plus haut rendement en HE de *Thymus vulgaris* (1.2%) est obtenu avant la fin de la floraison au mois juillet/aout. Tandis que **ÖZGüven et Tansi (1998); Badi et al.(2004) [41,137]** ont trouvé que le plus haut rendement en HE de *Thymus vulgaris* est obtenu pendant l'étape de pleine floraison. De même, **Nejad et al. (2008) [60]** ont prouvé que le rendement en HE de *Thymus caramanicus* (w/w%) durant les différentes étapes de croissance était de l'ordre: pleine floraison (2.8%)> début floraison (2.5%)> mis a graine (2.1%)> végétative (1.8%). Par ailleurs, la variation dans le rendement peut être attribuée non seulement à l'origine de la plante, à la technique d'extraction utilisée mais également à la période de la cueillette de la matière végétale [36,71].

Il apparaît ainsi une influence du cycle végétatif, non seulement sur le rendement en HE, mais aussi sur le profil chimique de celle-ci. Les résultats obtenus montrent que l'HE de thym extraite à partir d'échantillons collectés au mois de mai-juillet correspondant respectivement à l'étape de pleine et fin de floraison était relativement plus riche en composés que celle extraite au mois de mars durant le stade végétatif correspondant au début de floraison. Les huiles essentielles analysées sont caractérisées par une importante

fraction monoterpénique et par la prédominance de composés phénoliques (63.45-90.99%) : thymol (33.6-77.72%), le carvacrol (13,27-27.17%). Des résultats similaires ont été prouvés par **Bounatirou et coll (2007) [70]** sur l'HE de *Thymus capitatus* qui montrent que la composition chimique est dominée par les monoterpènes et la plus forte proportion de carvacrol (74%) a été obtenue en pleine floraison. Mêmes résultats ont été obtenus par **Nejad et al. (2008) [60]** sur l'HE de *Thymus caramanicus*. Tandis que **Naghidi et al. (2004) [41]** ont montré que le meilleur rendement d'HE de *Thymus vulgaris* et de thymol est obtenu au début de la floraison de la plante. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Shalby et Rezin (1992) [41]**. **MaGimpsey et al. (1994) [41]** ont montré que la variation saisonnière a un effet considérable sur le rendement et la composition d'essence de thym. Ils ont trouvé que le rendement et le contenu en phénol ont atteint un maximum à la fin de la période de floraison de la plante. Par contre, **ÖZGüven et Tansi (1998) [137]** ont trouvé que le plus haut rendement en HE et en thymol de *Thymus vulgaris* a été obtenu pendant l'étape de pleine floraison, tandis que le contenu maximal du carvacrol a été observé à la fin de floraison. Ainsi, **Piccaglia et Maroti (2004) [138]** ont trouvé que la teneur en phénol dans l'huile essentielle de thym grandi en Italie du nord, pendant l'étape de pleine floraison est variable d'une année à l'autre.

Les résultats obtenus montrent que la teneur la plus élevée en monoterpène phénolique (thymol, carvacrol) est obtenue lors de la récolte du mois du mars (début de la floraison) avec 91% (77.72% de thymol et 13.27% de carvacrol) contre 60.77% , 63.45% pour les récoltes de mai et de juillet respectivement. Tandis que pour ces précurseurs (*p*-cymène, γ -terpène), les teneurs les plus élevées sont obtenues lors de la récolte du mois de mai avec 20.85% contre seulement 1.173% pour la récolte de mars. En effet, quand la teneur de l'un de ces éléments (monoterpènes phénolique et ces précurseurs) augmente dans l'HE de thym, la teneur de l'autre diminue automatiquement. Ceci peut s'expliquer par la bioconversion simultanée du γ -terpène, *p*-cymène en thymol et en son isomère, le carvacrol [70,136,138] (Fig. 28).

deux premières heures de traitement. Dans ce cas, nous pouvons conclure qu'il serait économiquement plus rentable de fixer la durée d'extraction à 120 minutes.

V.1.2.2 Caractéristiques organoleptiques et indices physico-chimiques de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Les résultats des analyses physico-chimiques sont portés dans le tableau 16 ci-dessous et comparés à la référence provenant des normes AFNOR [17].

Tableau 16 : Caractères organoleptiques et les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Critères	Echantillons	Référence (AFNOR, 1996)	Conformité
Densité relative à 20°C	0.928	0.915-0.935	Oui
Indice de réfraction à 20°C IR	1.5015	1.490-1.5040	Oui
Pouvoir rotatoire à 20°C PR	0°	-3°-0°	Oui
Indice d'acide IA	5.1	4.1-5.2	Oui
Indice d'ester IE	50.765	49.5-52.55	Oui

Il est remarqué que les moyennes des paramètres de l'échantillon entrent parfaitement dans les fourchettes établies par les normes.

V.1.2.3 Composition chimique des huiles essentielles

Le tableau 17 présente les principaux composés identifiés (voir chromatogramme 4 ANNEXE 3). L'étude est surtout axée sur les composés volatils de teneur supérieure ou égale à 0.1%.

Tableau 17 : Composition relative de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* récoltées au mois de mars extraite par Entraînement à la vapeur d'eau

Composants	Temps de rétention	Teneurs relatives (%)
gamma-terpinene	5.33	1.233
Thymol	9.420	44.317
Carvacrol	9.520	34.983
Copaene	10.620	0.741
Beta-Caryophyllene	11.31	2.635
Alpha-gurjunene	11.520	4.577
Cyperene	11.63	0.528
Allo-Aromadendrene	11.91	0.885

4-tert-butylcatechol	12.13	0.630
Muurolene	12.730	0.899
Gamma-Cadinene	12.790	0.561
Ledene	13.10	1.027
Beta-Bisabolene	13.46	2.541
Beta-Cadinene	13.71	2.057
Alpha-humulene	14.13	0.756
Phenol,4-methoxy-2,3,6trimethyl	14.48	0.596
Naphtalene	21.13	0.613
TOTAL		99.579%

L'analyse de l'huile essentielle par CPG/SM, nous a permis d'identifier 17 composés représentant 99.579% de la composition chimique tels que le thymol, le carvacrol, l' γ -terpinene, β -caryophyllene, le α -gurjunene, le β -bisabolene et le β -cadinene. Le thymol est toujours le composé majoritaire avec un taux de 44,33%, suivi du carvacrol (34,98%).

Il faut noter une forte prédominance de la fraction sesquiterpénique représentant plus de 19% (β -caryophyllene (2.635%), le α -gurjunene (4.577%), le β -bisabolene (2.541%) et le β -cadinene (2.057%), etc...) par rapport à la fraction monoterpénique non phénolique évaluée à moins de 2% (γ -terpinene (1.223%)) du mélange (**Fig.30**). Il est remarqué également que la fraction monoterpénique phénolique (thymol, carvacrol) représente 79.30% de la composition chimique globale.

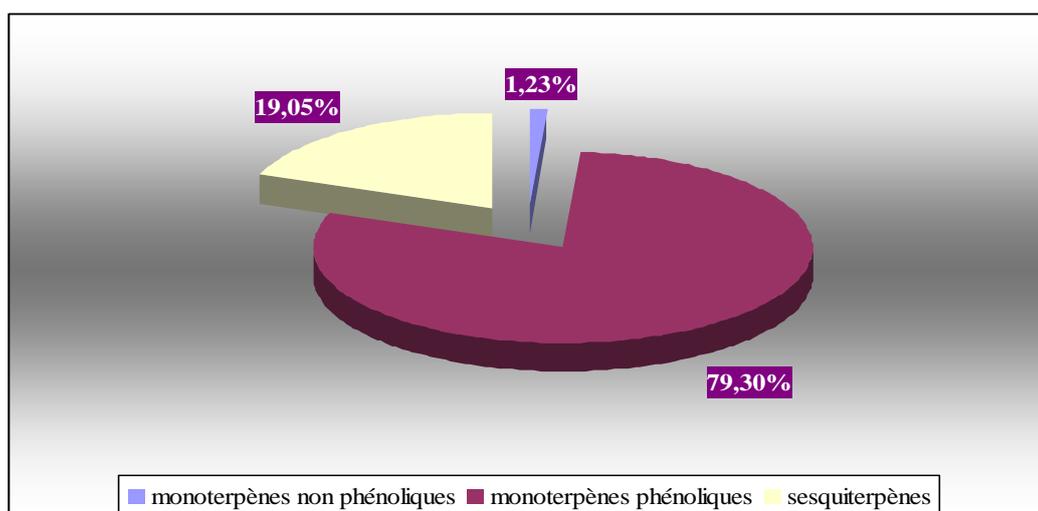


Fig. 30: Composition relative de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* extraite par entraînement à la vapeur d'eau.

De plus, l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle provenant de notre espèce comparée à celles d'autres huiles provenant de diverses régions d'Algérie extraite par entraînement à la vapeur d'eau a abouti aux résultats présentés dans le **tableau 18**

Tableau 18 : comparaison des teneurs relatives des composés majoritaires de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii* avec d'autres variétés du thym en Algérie

Composés / régions	Teneurs relatives (%)		
	1	2	3
Thymol	60.80	25.40	44.33
carvacrol	05.07	11.30	34.983
γ -terpinene	07.60	-	1.223
p-cymene	10.32	26.2	-
linalool	8.00	2.7	-
β -Caryophyllene	-	2.33	2.63
β -Bisabolene	-	0.72	2.54
β -Cadinene	2.84	-	2.06

1 : *Thymus numidicus* de la région de Berrahal [95] ;

2 : *Thymus vulgaris* de la région Est de Souk-Aras [95] ;

3 : *Thymus fontanesii* de la région de Lakdharia (échantillon étudié).

Par ailleurs la comparaison de nos résultats avec les travaux de **Haddaf et al. (2004) [95]**, sur l'huile essentielle de *Thymus numidicus* de la région de Berrahal et de *Thymus vulgaris* de la région Est de Souk-Ahras (**tableau 18**), nous a permis de déduire que l'huile essentielle de *Thymus numidicus* présentait le même composé majoritaire que celui de notre échantillon, à savoir le thymol mais à une plus forte proportion (60,8% contre 44,33%), en revanche, l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est de type chimique à p-cymène (26,2%). Par ailleurs, la teneur en carvacrol est nettement plus forte dans notre échantillon (34.983% contre 11.3% dans l'échantillon (2) et 5.07% dans (1)). Cependant, il existe une différence importante concernant certains composés. En effet, γ -terpinene (1.233%) et β -cadinene (2.057%), qui ont été identifiés dans notre échantillon, ne sont pas décrits dans l'échantillon (2).

Il faut noter également que notre extrait renferme la plus grande teneur en composés phénoliques (thymol et carvacrol), elle présente 79.30% de la totalité d'huile

extraite. L'échantillon (1), possède une composition riche en p-cymène (10.32%) et linalool (8.00%) qui n'ont pas été identifiées dans notre huile essentielle. Alors que pour le β -caryophyllene elle est comparable à celle de l'échantillon (2). Quant à la teneur en β -bisabolene et β -cadinene, elle est différente des autres échantillons (1) et (2).

Cette différence peut être attribuée aux conditions climatiques et géographiques qui changent d'une région à une autre, et à la période de la cueillette [15,36,37,38]. A titre d'exemple, la matière végétale utilisée lors de cette étude a été cueillie au mois de mars (2007) alors que celle étudiée à Souk -Ahras (*Thymus vulgaris*) en juin (2002).

Il est constaté que notre espèce est plus avantageuse du point de vue pharmaceutique par rapport aux autres espèces algériennes

V.1.2.4 Influence du temps d'extraction sur la composition de l'huile essentielle de *T. fontanesii*

Dans le but de déterminer la variation de la composition de l'HE de *Thymus fontanesii* durant l'extraction, il est procédé à l'analyse des différentes fractions obtenues par entraînement à la vapeur d'eau en fonction du temps dont les résultats sont détaillés dans le **tableau 19** (voir chromatogrammes 5,6,7,8: ANNEXE 3) et représentés dans la **Fig.31**.

Tableau 19 : Teneurs relatives des constituants majoritaires de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* en fonction du temps

Fraction (min)	Teneurs relatives des différentes classes chimiques (%)		
	Monoterpene non phenoliques	Monoterpene phenoliques	Sesquiterpenes
15	p-cymène 0.461% γ -terpionene 8.290% bornéol 0.896% 4-terpineol 0.840% linalool 0.277% Total: 10.764%	Thymol 72.145% Carvacrol 0.938% Total: 73.083%	Copaene 1.357% Cyperne 2.668% Junipen 4.506% β -Caryophyllene 2.668% α -Gurjunene - γ -muurolene 1.399% γ -cadinene 0.831% β -Bisabolene 1.194% β -Cadinene 0.666% Total: 15.289%

30	p-cymène - γ-terpionene 0.681% linalool - bornéol 0.809% 4-terpineol 0.293% Total : 1.783%	Thymol 78.154% Carvacrol 1.132% Total : 79.286%	Copaene 0.665% Cyperne 0.231% Junipen - β-Caryophyllene 2.237% α-Gurjunene 3.936% γ-muurolene 1.266% γ-cadinene - β-Bisabolene 2.065% β-Cadinene 1.661% Total: 12.061
60	p-cymène - γ-terpionene - linalool - bornéol 0.860% 4-terpineol - Total : 0.860%	Thymol 83.329% Carvacrol 1.260% Total : 84.589%	Copaene 0.640% Cyperne - Junipen - β-Caryophyllene 2.161% α-Gurjunene 3.858% muurolene 1.075% β-Bisabolene 1.968% β-Cadinene 1.705% Total : 11.407%
90-120	p-cymène - γ-terpionene - linalool - bornéol - 4-terpineol - Total : 0.0%	Thymol 89.843% Carvacrol 1.150% Total : 90.993%	Copaene - Cyperne - β-Caryophyllene 1.900% α-Gurjunene 3.634% muurolene - β-Bisabolene 1.862% β-Cadinene 1.611% Total : 9.007%

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de TF est principalement constituée de monoterpéniques et sesquiterpéniques et la récupération de ces composants est faite selon l'ordre croissant de leur température d'ébullition.

L'étude des différentes fractions de *Thymus fontanesii* nous a permis de mettre en évidence une évolution dans sa composition chimique durant l'extraction. Il est observé donc: Une nette diminution de la concentration des hydrocarbures monoterpènes qui passe de 10.764% pour la fraction F₁ à 0% pour la fraction F₇. En effet, le p-cymène est récupéré en premier temps suivi du γ-terpinène, linalool, bornéol, 4-terpineol. Ces composés atteignent leur teneur maximale (0.461%, 8.290%, 0.277%, 0.896%, 0.840%) au bout de quinze minutes d'extraction pour diminuer par la suite. Cela peut s'expliquer par la très

grande volatilité de ces composés qui sont récupérés dès les premières minutes de l'extraction.

Les composés sesquiterpéniques, de température d'ébullition plus élevée, apparaissent les premiers dans le distillat. Il est remarqué aussi une diminution de la concentration des sesquiterpènes oxygénés et hydrocarbonés au cours de l'extraction d'où le copaene, le cyperene, le muurolene et le junipen sont présents avec une teneur maximale (1.357%, 2.668%, 1.399%, 4.506% respectivement) après quinze minute de traitement pour diminuer par la suite, tandis que des composés tels que le β -caryophyllene (2.237%), de α -gurjunene (3.936%) ne commencent à apparaître qu'à partir de 30 min et d'autres composés comme le β -cadinene sont présents dans la troisième fraction F₃ après la 60 min d'extraction avec une teneur maximale (1.705%). Ceci peut être expliqué par le fait que les composés sesquiterpéniques sont moins volatils que les monoterpènes car ils sont constitués de trois molécules isopréniques et non pas de deux.

Les composés majoritaires dans toutes les fractions du temps sont des monoterpènes phénoliques (thymol, carvacrol), leurs teneurs augmentent pour atteindre (90.99%) dans la fraction récupérée après 75 minutes d'extraction, ce qui ne veut pas dire que ces composés sont moins volatils que les précédents, mais cela peut s'expliquer par l'augmentation de la concentration du thymol (de 72.14% à 89.84%).

Donc, il faut conclure que la majeure partie des composés volatils est extraite durant les 75 premières minutes d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau.

L'évolution de la concentration des composés majoritaires de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii* durant l'extraction en fonction du temps est illustrée par la **Fig. 31**.

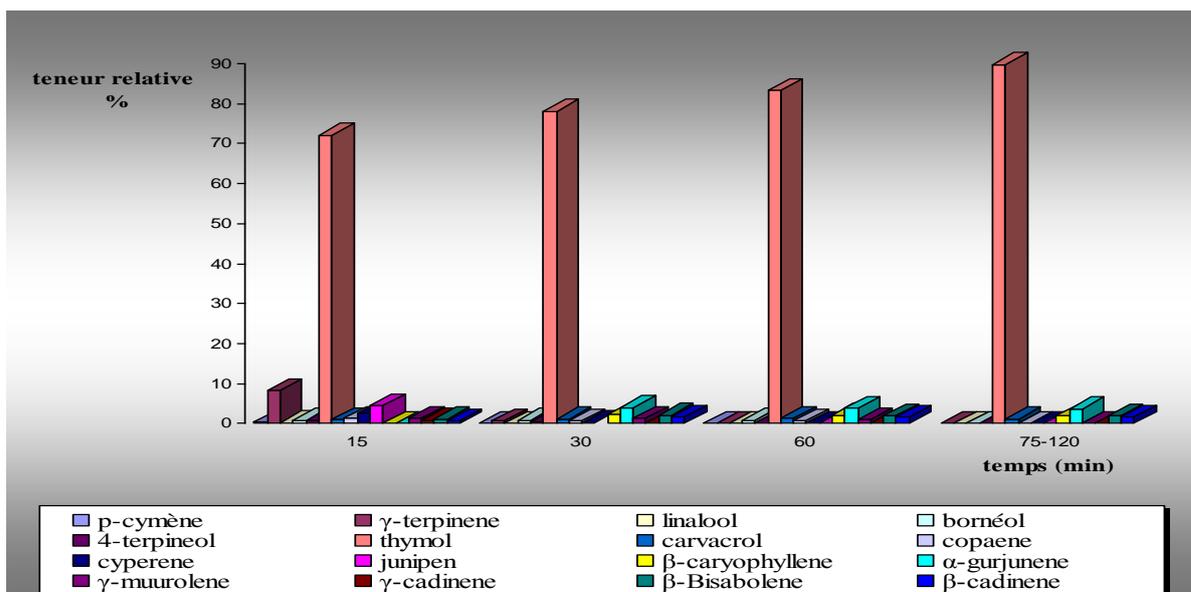


Fig. 31: Evolution temporelle de la teneur des composés majoritaires de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii*

La Fig. 32 présente en histogramme la variation de la composition chimique par famille de composés.

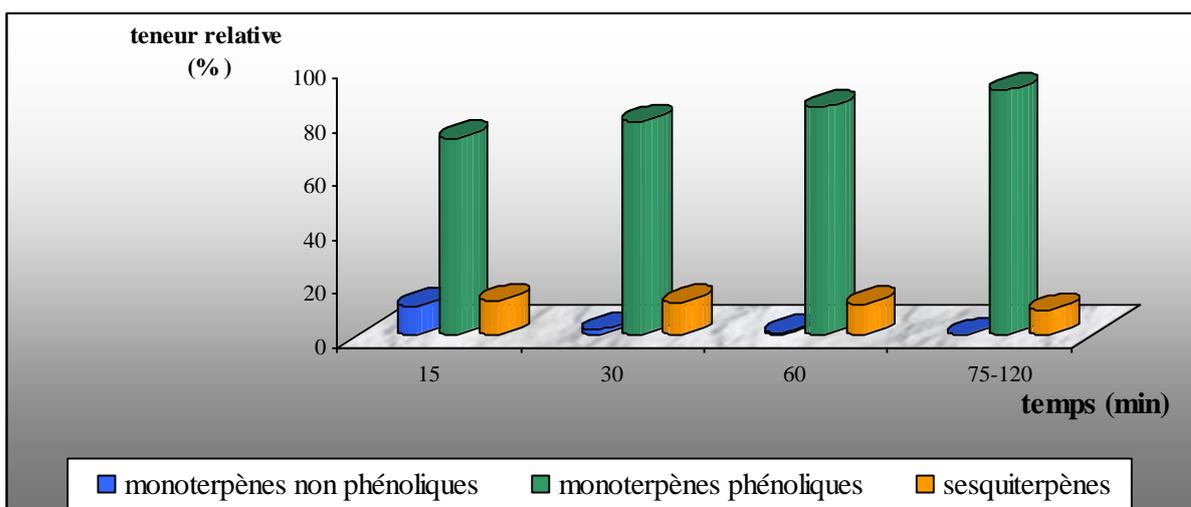


Fig.32 : variation des teneurs relatives des principales classes chimiques de l'huile essentielle au cours de l'entraînement à la vapeur du thym

Les histogrammes de la Fig.32 montrent que la proportion des composés monoterpènes phénoliques (thymol, carvacrol) reste globalement majoritaire pour toutes les fractions récupérées. Ainsi, elle augmente graduellement au cours de l'extraction pour atteindre 90,993% en fin d'extraction.

Il est remarqué que la teneur en sesquiterpènes est plus importante dans toutes les fractions par rapport à celle des monoterpènes non phénoliques, elle atteint 10,764% après 15

minutes de traitement, quant aux sesquiterpènes, ils atteignent 15.289% puis diminuent pour atteindre 9% en fin d'extraction

V.1.3 Etude comparative

Il est réalisé une étude comparative entre le procédé d'extraction par hydrodistillation et par entraînement à la vapeur d'eau sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles obtenues ainsi que leurs caractéristiques.

V.1.3.1 Etude cinétique : Suivi du rendement

L'évolution du rendement de l'huile essentielle de thym pour les deux techniques utilisées que sont l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau est illustrée par la **Fig.33**.

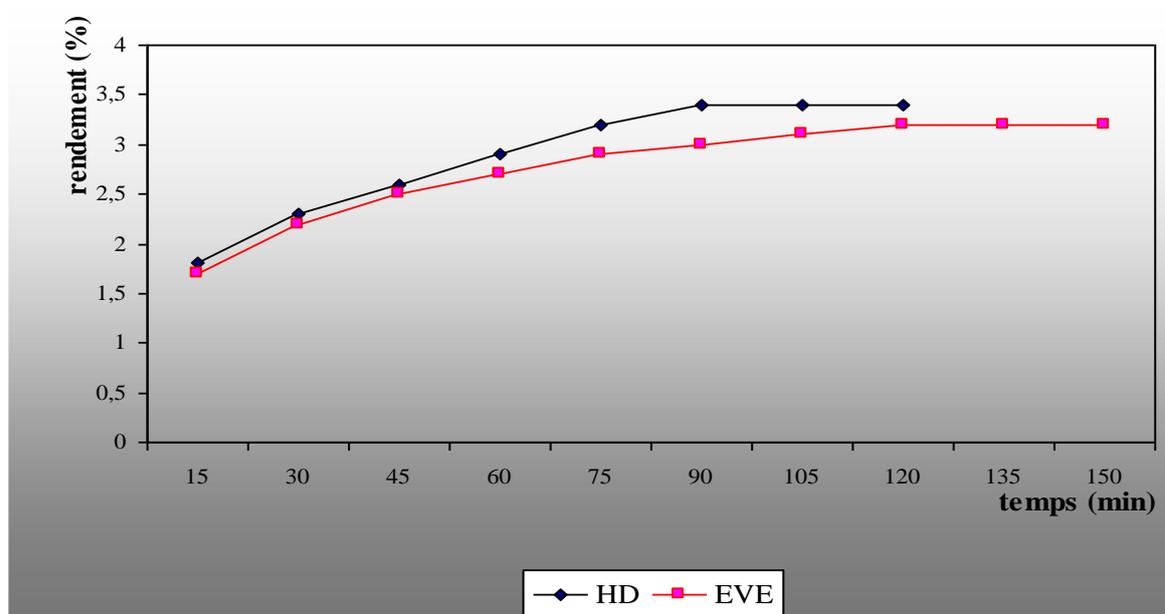


Fig. 33 : Variation du rendement d'huile essentielle du *Thymus fontanesii* en fonction de la technique d'extraction

La cinétique d'extraction peut se diviser en trois étapes :

- Une première partie relative au chauffage de la matière végétale et correspondant à la montée en température au sein du réacteur, étape durant laquelle aucune extraction d'huile essentielle ne se produit. Cette étape est presque identique pour les deux techniques.
- La seconde étape correspond au début de la distillation de l'huile essentielle proprement dite. Au cours de cette étape, le rendement augmente de façon significative jusqu'à environ 3.2% pour l'hydrodistillation et 3% pour l'entraînement à la vapeur d'eau.

- Enfin la dernière et troisième étape indique un ralentissement de l'augmentation du rendement avec apparition d'un pseudo palier.

L'augmentation du rendement marque les premières minutes de la phase d'extraction de l'huile essentielle. En effet, l'extraction par hydrodistillation permet l'obtention d'une huile essentielle avec un rendement supérieur à celui obtenu par entraînement à la vapeur d'eau (respectivement 3.4% et 3.2%). Le second palier est visiblement atteint beaucoup plus rapidement dans le cas de l'hydrodistillation. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que l'hydrodistillation se déroule en 90 minutes alors que l'entraînement à la vapeur d'eau nécessite 120 minutes pour épuiser la plante en huile essentielle. Il est constaté qu'environ 94.11% d'huile essentielle de thym sont extraits au cours de 75 premières minutes de l'extraction par hydrodistillation pour arriver à un plateau au bout d'une heure et demi de traitement. Contrairement, à l'entraînement à la vapeur d'eau où les 75 premières minutes d'extraction conduit à environ 90.62% de l'huile essentielle pour se stabiliser après deux heures de traitement. Cette différence de rendement obtenue peut trouver une explication au niveau des conditions opératoires. En effet, par HD la matière en contact avec l'eau subit un chauffage uniforme et constant qui dégrade plus facilement la matière végétale permettant ainsi une libération plus efficace de l'extrait volatil.

Donc, il est conclu que dans le cas de l'extraction d'HE de *Thymus fontanesii*, la méthode la plus performante en rendements d'extraction a été l'hydrodistillation. Des résultats similaires ont été trouvés par **Lassaad et al. (2006) [141]** avec l'huile essentielle de *Thymus capitatus*.

Les extraits ainsi obtenus dans les deux méthodes d'extraction ont été analysés et comparés.

V.1.3.2 Composition chimique de l'huile essentielle

Les analyses de l'essence produite par hydrodistillation sont comparées à celles données par l'entraînement à la vapeur d'eau. Les résultats sont reportés dans le **tableau 20**. Ce tableau compile les pourcentages des différentes molécules obtenues par CPG/SM. L'étude est surtout axée sur les composés volatils majoritaires, les molécules ayant des fragments de masse inférieure à 0,1% n'ont pas été rapportées.

Tableau 20: Composition chimique de l'huile essentielle de thym obtenue par hydrodistillation et par entraînement à la vapeur d'eau

Composants	Teneur relative (%)	
	Hydrodistillation	Entraînement à la vapeur d'eau
Gamma-Terpinene	1.173	1.223
Linalool	4.860	-
Thymol	77.723	44.317
Carvacrol	13.278	34.983
Copaene	-	0.741
Beta-Caryophyllene	2.033	2.635
Alpha-gurjunene	0.930	4.577
Cyperene	-	0.528
Allo-Aromadendrene	-	0.885
4-tert-butylcatechol	-	0.630
Muurolene	-	0.899
Gamma-Cadinene	-	0.561
Ledene	-	1.027
Beta-Bisabolene	-	2.541
Beta-Cadinene	-	2.057
Naphtalene	-	0.613
Total	99.997%	98.217%

L'examen du tableau 20 nous permet de constater que qualitativement, l'huile essentielle de thym, qu'elle soit hydrodistillée ou distillée à la vapeur d'eau est constituée par un nombre de composés aromatiques passant de 6 pour l'HD à 15 pour l'EVE.

La différence dans le nombre de molécules aromatiques constituant l'huile essentielle provient essentiellement de la disparition de composés entre l'HD et l'EVE.

Du point de vue quantitatif, des différences sont observées au niveau de la teneur des constituants identifiés. Le thymol et le carvacrol sont les deux composés majoritaires de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*. Le thymol est, dans tous les cas, le constituant majeur avec une teneur de 77.72% en HD et 44.31% en EVE. Le carvacrol n'est présent qu'à un taux de 13.27% en HD et 34.983% en EVE.

L'extrait le plus riche en composés sesquiterpéniques a été obtenu par l'entraînement à la vapeur, Alors que la concentration la plus haute en monoterpènes non phénoliques a été obtenue par l'hydrodistillation. Le γ -terpinène, et le linalol, le β -cadinène et le β -caryophyllène contribuent aussi à la composition de cette huile essentielle mais de façon moins prépondérante (**tableau 21**). Le γ -terpinène est présent à un taux de 1.233% dans l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur d'eau et à un taux de 1.173% dans celle obtenue par hydrodistillation. Le linalool qui représente 4.86% de l'huile essentielle de thym hydrodistillée ne se retrouve pas dans l'huile essentielle distillée à la vapeur d'eau.

Le α -gurjunène et le β -caryophyllène sont présents avec une teneur notable : le β -caryophyllène (2.033% en HD et 2.63% en entraînement à la vapeur d'eau) et le α -gurjunène (0.93% en HD et 4.577% en entraînement à la vapeur d'eau), tandis que le copaène, le β -bourbonène, le cypérene, le muurolène et autres composés sesquiterpéniques (**tableau 21**) sont uniquement présents dans l'huile essentielle distillée à la vapeur d'eau.

L'explication de la différence de composition chimique entre les procédés d'extraction par HD et EVE pourrait être basée principalement sur des phénomènes de solubilité et de formation des émulsions.

La **Fig.34** présente en histogramme expliquant la variation de la composition chimique par famille de composés en fonction de la technique d'extraction utilisée.

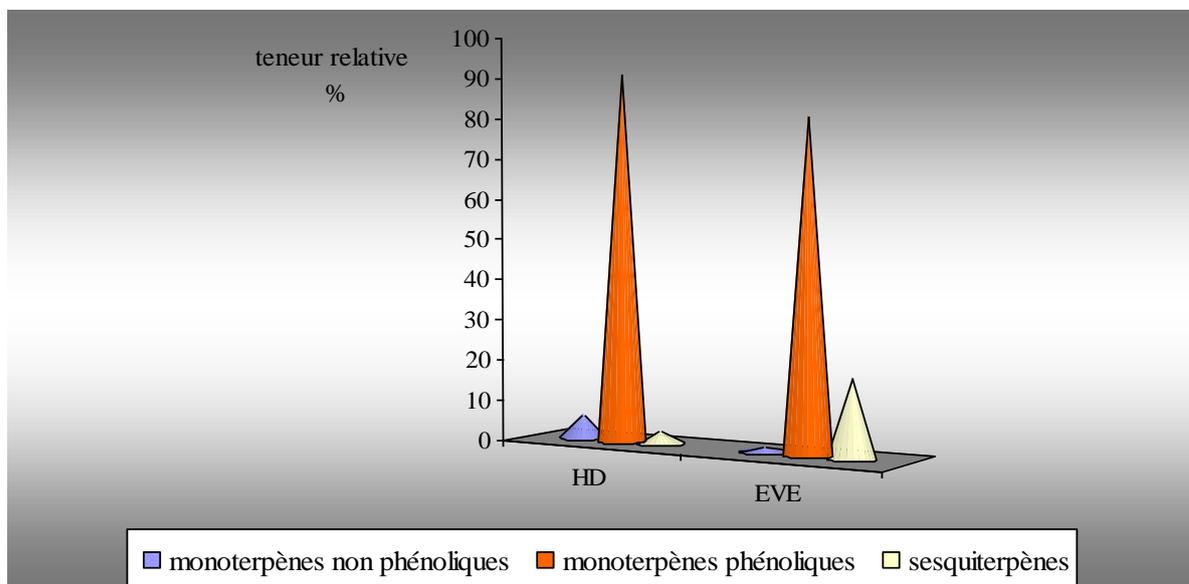


Fig.34 : variation des teneurs relatives des principales classes chimiques de l'huile essentielle en fonction de la technique d'extraction

Quelque soit la technique d'extraction utilisée, il faut noter une forte prédominance de la fraction monoterpénique phénolique (thymol, carvacrol) par rapport à la fraction non phénolique (linalool, γ -terpinène) et la fraction sesquiterpénique (β -caryophyllène, α -humulène, α -gurjunene, etc...). Elle est beaucoup plus élevée dans l'HE obtenue par hydrodistillation que dans celle extraite par entraînement à la vapeur d'eau.

Comparativement aux résultats obtenus à partir de l'hydrodistillation, l'huile essentielle du thym extraite par l'entraînement à la vapeur d'eau possède une fraction en composés sesquiterpéniques enrichie. Il peut expliquer ces observations par le fait que durant la distillation, l'eau bouillante pénètre dans les cellules végétales et solubilise une partie de l'essence des glandes sécrétrices.

V.1.3.3 Influence de la technique d'extraction sur la teneur en composés phénoliques extraits

Pour suivre l'influence du mode d'extraction sur la composition phénolique de l'huile essentielle de thym, la Fig.35 présente les histogrammes d'évolution des teneurs des deux composés phénoliques de l'huile essentielle du thym : le thymol et le carvacrol.

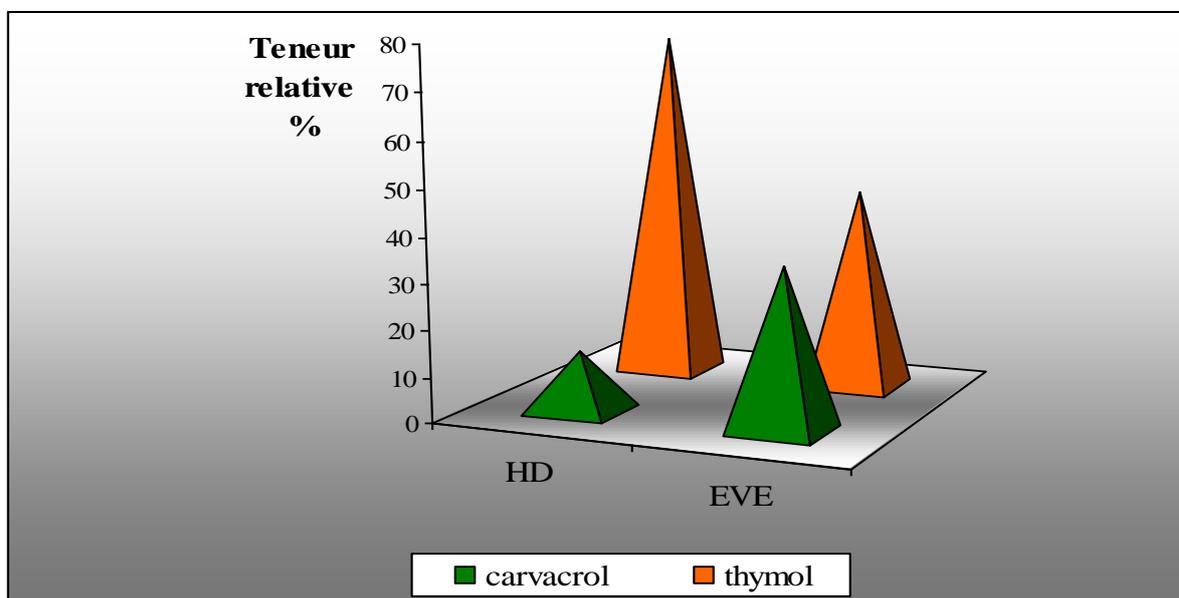


Fig.35 : Evolution temporelle de la teneur des composés phénoliques de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii* en fonction de la technique d'extraction

L'observation des histogrammes de la Fig.35 montre que la proportion de thymol est en effet nettement plus importante par rapport à celle du carvacrol quelque soit la technique

d'extraction utilisée. Les huiles essentielles extraites par HD ont une concentration en thymol toujours supérieure à celles extraites par entraînement à la vapeur d'eau.

Suite à ses observations, nous retiendrons la méthode d'hydrodistillation comme étant la plus adaptée pour la suite de nos travaux. En effet, c'est un procédé simple à mettre en oeuvre, beaucoup plus efficace (77.72% de thymol formé au bout d'une heure et demie de traitement).

V.1.3.4 Constantes physico-chimiques

Les constantes physico-chimiques de l'huile essentielle du thym ont été déterminées selon les normes AFNOR sur les huiles essentielles. Les résultats des mesures de densité, d'indice de réfraction, de pouvoir rotatoire sont regroupés dans le **tableau 21**.

Tableau 21 : comparaison des caractéristiques de l'huile essentielle de thym extraite par hydrodistillation et par entraînement à la vapeur d'eau

Caractéristiques et propriétés physiques	HE extraite par hydrodistillation	HE extraite par entraînement à la vapeur d'eau
Couleur	jaunâtre	Jaunâtre
Densité à 20°C	0.925	0.928
Indice de réfraction	1.5015	1.5015

A partir des valeurs présentées dans de **tableau 21** il constate que les densités et les indices de réfractons ont des valeurs relativement proches pour l'huile essentielle de thym quelque soit son mode d'extraction. Tandis que la couleur de l'huile hydrodistillée est légèrement différente par rapport à celle extraite par entraînement à la vapeur d'eau.

V.2 Résultat de l'extraction de thymol

V.2.1 Par cristallisation sous l'action du froid

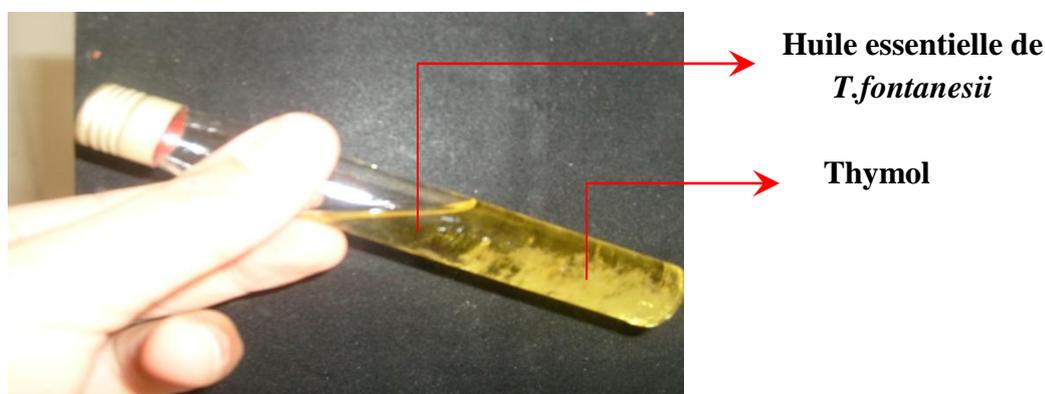


Fig.36: Thymol extrait par cristallisation sous l'action du froid

V.2.2 Par extraction chimique



Fig. 37: Thymol extrait par la méthode chimique

V.2.3 Identification de thymol extrait

Le thymol extrait se présente en cristaux incolores fusibles à 50 – 51.5°C; il distille à 251.8°C à la pression normale de 0.760. Il possède une odeur de thym assez forte. Il est très peu soluble dans l'eau (1.4g/ l) à 40°C, en revanche, il est très soluble dans la plupart des solvants organiques notamment: l'éthanol (1000g/l), l'éther (700g/l) ses valeurs de solubilité sont données à 40°C. Avec le thymol le FeCl₃ ne donne pas de réaction colorée.

Les résultats de toutes les réactions d'analyse qualitative de thymol extrait sont illustrés dans le **tableau 22**.

Tableau 22: Caractéristiques du thymol

Réaction	Couleur obtenue	Discussion
Réaction 1	Rouge	Conforme
Réaction 2	Violette	Conforme
Réaction 3	Vert-bleu	Conforme

Il est constaté que résultats obtenus coïncidents avec ceux mentionnés par la Pharmacopée européenne. L'ensemble de nos résultats montre que le produit extrait de l'HE de *Thymus fontanesii* est le thymol.

L'identification chimique du thymol est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser notre produit extrait. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques CG/SM, cette dernière, est souvent utilisée comme moyen analytique pour l'analyse structurale des substances volatiles.

V.2.4 Confirmation des structures du thymol extrait par CPG / MS

Une analyse par couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* avant et après l'extraction du thymol, de thymol extrait et de celle synthétique a été envisagée pour confirmer que notre produit extrait est vraiment le thymol (voir chromatogrammes 9,10,11 ANNEXE 3).

V.3 Résultats de la formulation des pâtes

V.3.1 Résultat de contrôle de la matière première

Les médicaments administrés par voie percutanée posent beaucoup moins de problèmes que ceux des autres voies, c'est la raison qui nous a poussés à choisir dans cette voie la formulation la plus classique à savoir la pâte. Mais le contrôle des matières premières est obligatoire. Toutes les substances utilisées sont contrôlées par les méthodes chimiques et/ou physiques. Les substances contrôlées sont conformes aux normes de pharmacopée Européenne et de AFNOR (pour les huiles essentielles utilisées) donc peuvent être utilisées en qualité de produits pharmaceutiques.

V.3.2 Résultats de préparation

Pour avoir une meilleure consistance des pâtes il a pris différentes quantités de glycérol et d'eau. Différents essais ont été réalisés pour déterminer les quantités nécessaires des ingrédients à ajouter.

Tableau 23: Essais de préparation de la pâte à base de l'HE de *Thymus fontanesii*

Constituants	Essai 1 en g	Essai 2. en g	Essai 3. en g	Essai 4 en g.
Glycérol	20	17	14	12
H₂O	2	4	6	8
Bentonite	30	30	30	30
ZnO	25	25	25	25
Acide salicylique	3	3	3	3
Tetraborate de Na	5	5	5	5
Formaldéhyde	x	x	x	x
CuSO₄	0,5	0,5	0,5	0,5
HE de menthe	x	x	x	x
HE de thym.F.	x	x	x	x

Tableau 24: Essais de préparation de la pâte à base de thymol extrait

Constituants	Essai 1 en g	Essai 2. en g	Essai 3. en g	Essai 4 en g.
Glycérol	20	17	14	12
H ₂ O	2	4	6	8
Bentonite	30	30	30	30
ZnO	25	25	25	25
Acide salicylique	3	3	3	3
Tetraborate de Na	5	5	5	5
Formaldéhyde	x	x	x	x
CuSO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5
HE de menthe	x	x	x	x
Thymol extrait	x	x	x	x

Les expériences ont montré que l'essai 4 (pour les deux pâtes) donne de bons résultats c'est à dire 12 g de glycérol sont suffisantes pour faciliter l'étalement de la pâte sur la peau et la présence relative de la grande quantité d'eau est nécessaire pour la dissolution des principes actifs, tels que tetraborate de Na, CuSO₄ et acide salicylique (partiellement).

V.4 Contrôles des produits finis

V.4.1 Examen des caractéristiques macroscopiques des deux pâtes

V.4.1.1 Essais galéniques : (Fig. 38,39)

Aspect: assez épaisse sans présence de grumeaux à l'étalement

Couleur: verdâtre

Odeur: arôme de thym et de la menthe.



Fig. 38: Pâte formulée à base d'HE



Fig.39: Pâte formulée à base de thymol

V.4.1.2 Homogénéité

Macroscopiquement, nous vérifions l'homogénéité de chaque pâte en étalant une couche mince sur une surface plane d'une feuille qu'on plie, que nous ouvrons et sur laquelle nous effectuons l'étalement d'une deuxième couche. Il est vérifié à l'œil nu l'absence des agrégats et la bonne répartition des poudres. Dans le cas de nos pâtes, nous ne voyons aucune présence de grumeaux, donc elles sont parfaitement homogènes

V.4.1.3 Mesure du pH

Le pH de la pâte à base d'HE est égal à 5,7 tandis que celui de la pâte à base de thymol est de 6.7. D'après la valeur du pH qui est ni très acide ni très basique nous pouvons dire que les deux pâtes ne provoquent pas d'irritation sur la peau.

V.4.2 Essai de la tolérance locale

La réaction cutané érythème et œdème est évaluée et quantifiée sur la zone préalablement scarifiée et sur la zone intacte (**Fig.40**), selon l'échelle numérique proposée par le « journal officiel de la république Française.



Fig. 40: Résultats obtenus après 72h d'application des deux pâtes formulées.

V.4.2.1 Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée de la pâte de l'HE

Les résultats de l'évaluation de l'irritation cutanée primaire chez les lapins traités par la pâte d'HE sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 25 : Evaluation de l'indice d'irritation cutanée primaire chez les lapins traités par la pâte à base d'huile essentielle de thym.

N° De Lapin	Flanc Traité				Flanc Témoin			
	Œdème		Erythème		Œdème		Erythème	
	J ₁ (24h)	J ₃ (72h)						
1	0	0	1	0	0	0	1	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	1	0	0	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0	1	0
5	0	0	1	0	0	0	1	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0

D'après le tableau 25, les phénomènes observés sont uniquement des érythèmes avec un degré variable au cours de la première observation et une diminution remarquable après 72h. Il est noté également une absence totale d'œdèmes durant toute la période de l'expérimentation.

Tableau 26: Evaluation des réactions cutanées.

N° de lapin	Œdème + Erythèmes 24h + 72h Flanc traité	Oedèmes + Erythèmes 24h + 72h Flanc témoin
1	1	1
2	0	0
3	1	0
4	1	1
5	1	1
6	0	0
Valeurs cumulées	4	3

Pour classer notre produit, il faut calculer l'indice d'irritation primaire à partir de l'équation suivante :

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

Avec :

24 = nombre de lapin (6) × nombres de zones testées (traité et témoin = 2) × nombre de type d'irritation (œdème et érythème = 2)

Donc :

$$IP = 4+3 / 24 = 0.29$$

$$IP = 0.29$$

Selon le résultat obtenu, l'indice d'irritation primaire (**IP = 0.29**) est inférieur à 0.5 ce qui nous amène à conclure que la pâte à base de HE de thym est non irritante pour la peau.

V.4.2.2 Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée de la pâte de thymol

Les résultats de l'évaluation de l'irritation cutanée primaire chez les lapins traités par la pâte de thymol sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 27: Evaluation de l'indice d'irritation cutanée primaire chez les lapins traités par la pâte à base de thymol extrait.

N° De Lapin	Flanc traité				Flanc Témoin			
	Œdème		Erythème		Œdème		Erythème	
	J ₁ (24h)	J ₃ (72h)						
1	0	0	1	0	0	0	1	0
2	0	0	2	0	0	0	2	0
3	0	0	2	0	0	0	2	0
4	0	0	2	0	0	0	1	0
5	0	0	1	0	0	0	1	0
6	0	0	1	0	0	0	2	0

D'après le tableau 27, les phénomènes observés sont uniquement des érythèmes avec un degré variable au cours de la première observation et une diminution remarquable après 72h. On note également une absence totale d'œdèmes durant toute la période de l'expérimentation.

Tableau 28: Evaluation des réactions cutanées.

N° de lapin	Cedème + Erythèmes 24h + 72h Flanc traité	Oedèmes + Erythèmes 24h + 72h Flanc témoin
1	1	1
2	2	1
3	2	2
4	2	2
5	1	1
6	1	1
Valeurs cumulées	9	8

Pour classer notre produit, il faut calculer l'indice d'irritation primaire à partir de l'équation suivante :

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

Donc :

$$IP = 9+8 / 24 = 0.70$$

$$IP = 0.70$$

La pâte à base de thymol présente un indice d'irritation primaire cutanée IP égal à **0.70**. Donc selon l'échelle numérique de Draize, elle est considérée comme un produit à action légèrement irritante pour la peau. Selon le résultat obtenu, l'indice d'irritation primaire IP est compris entre 0.5 et 2 ce qui nous amène à conclure que la pâte de thymol extrait est légèrement irritante pour la peau.

V.4.3 Discussion

Le test de la toxicité locale de nos produits a révélé l'apparition d'érythème chez quelques lapins, après 24 heures de l'application, due à la pénétration de ces derniers dans l'épiderme, à travers la couche cornée, les cellules basales ne restent pas insensibles à ce passage. Ainsi, l'apparition d'érythèmes assez remarquables sur les flancs traités peut être la conséquence de l'affrontement des lapins entre eux lors de leur hébergement, la concentration de la pâte appliquée ou d'une hypersensibilité de l'animal à la pâte ou à un de ses composants. Alors que, l'apparition d'érythème assez remarquable sur les flancs témoins de quelques lapins peut être due à la scarification qui a atteint de derme

V.5 Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne

L'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de notre huile essentielle de *Thymus fontanesii*, de son thymol extrait et de deux pâtes formulées à été faite sur 5 bactéries et deux levures provenant de la collection du laboratoire microbiologique du **CRD-SAIDAL**, ainsi que, l'activité antifongique de l'HE de thym et de la pâte à base de cette huile sur deux dermatophytes provenant de **l'Institut Pasteur d'Algérie**, a été faite par la méthode des aromatogrammes. Le pouvoir antimicrobien de tous ces produits est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Mutai et al., (2009) [142]**. Ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne en 5 classes :

- 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: **$D < 10$ mm**

V.5.1 Pour les bactéries et les levures

Le diamètre moyen de la zone d'inhibition observée autour des disques imprégnés d'HE pure, de solution alcoolique de thymol, des deux pâtes formulées et des deux pommades commercialisées (Mycocide, Mycotine) après 24 heures d'incubation à 37°C pour les bactéries et après 48 heures à 25°C pour les levures, ainsi que leurs pourcentages d'inhibitions sont résumés dans le **tableau 29**.

Tableau 29 : Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition et le % d'inhibition de l'HE pure, de thymol extrait, des pâtes formulées et des pommades commercialisées (Mycotine et Mycocide) vis-à-vis des cinq bactéries et deux levures.

souche		HE de Thymus. F		thymol		pate d' HE		pate de thymol		Mycotine		Mycocide	
		D (mm)	I %	D (mm)	I %	D (mm)	I %	D (mm)	I %	D (mm)	I %	D (mm)	I %
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	58.50	65.00	30,00	33.33	59.50	66.11	56,00	62.22	0,00	0.00	21,00	23.33
	<i>Bacillus subtilis</i>	43.33	48.14	31,00	34.44	57.50	63.88	56,00	62.22	0,00	0.00	24,00	26.66
	<i>Enterococcus faecalis</i>	33.16	36.84	26,00	28.88	56,00	62.22	52,00	57.77	0,00	0.00	12,00	13.33
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	37.33	41.47	26.75	29.72	39.66	44.06	38.83	43.14	0,00	0.00	0,00	0.00
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13.33	14.81	14.25	15.83	37,25	41.38	37,50	41.66	0,00	0.00	0,00	0.00
levures	<i>Candida albicans.</i>	47,00	52.22	26,00	28.88	56.40	62.66	51.16	56.84	21,50	23.88	12,00	13.33
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60.75	67.50	45,00	50.00	69,00	76.66	67.50	75.00	27,66	30.73	33,00	36.66

Selon l'échelle citée par Mutai et al., 2009: [142].

L'HE de *Thymus fontanesii* pure a une très forte activité sur toutes les souches bactériennes testées ($D > 30$ mm) sauf sur *Pseudomonas aeruginosa* ($D < 16$ mm). Elle diminue la masse mycélienne de *Staphylococcus aureus*, de *Bacillus subtilis*, de *Enterococcus faecalis*, de *Escherichia coli*, et de *P. aeruginosa* respectivement de 65, 48.14, 36.84, 41.47, 14.81%. Les diamètres d'inhibition varient de 13 mm à 58.5 mm. Le plus grand diamètre d'inhibition est obtenu avec *Staphylococcus aureus* (58.5 mm) et le plus petit avec *Pseudomonas aeruginosa* (13.33 mm). Donc, les résultats obtenus montrent que l'HE de *T. fontanesii* possède un large spectre d'activité antibactérienne sur les bactéries Gram + que Gram -. L'HE de *Thymus fontanesii* possède également une activité fortement inhibitrice sur les deux levures utilisées surtout contre *Saccharomyces cereviceae* dont la zone d'inhibition est de 60 mm de diamètre. Elle réduit également la croissance mycélienne de *Saccharomyces cereviceae* et de *Candida albicans* respectivement de 67.5% et 52.22% (**Fig.41**).

Le thymol a une activité très fortement inhibitrice sur *Staphylococcus aureus* (30 mm) et sur *Bacillus subtilis* (31 mm), par contre cette activité (de thymol) est fortement inhibitrice sur *Enterococcus faecalis* (26 mm) et sur *Escherichia coli* (26.75 mm) et légèrement inhibitrice sur *Ps. aeruginosa* (14.25 mm). Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne sont compris entre 15.83 et 34.44%. Il est remarqué aussi que le thymol a une très forte activité sur *Saccharomyces cereviceae* avec un diamètre d'inhibition de 45 mm et un taux d'inhibition de 67.5%. Nous notons également une activité fortement inhibitrice contre *Candida albicans* ($D = 26$ mm) (**Fig. 42**).

Les deux pâtes préparées à base d'HE et de thymol ont une très forte activité inhibitrice sur toutes les souches bactériennes testées dont les valeurs moyennes du diamètre des zones d'inhibition dépassent 37 mm. Elles ont donné une activité antibactérienne à large spectre agissant aussi bien sur les bactéries Gram + que Gram -. De même, les deux pâtes ont révélé une très forte activité inhibitrice contre les deux levures utilisées dont les valeurs moyennes de la zone d'inhibition ont dépassé les 50 mm. Pour les deux pâtes, les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne (des bactéries et de levures) sont compris entre 41.38% et 76.66% (**Fig.43,44**).

L'étude de l'activité de la mycocide et de la mycotine montre que la mycocide a une activité fortement inhibitrice sur *Staphylococcus aureus* (21 mm), sur *Bacillus subtilis*

(24mm), une activité légèrement inhibitrice sur *Enterococcus faecalis* (12 mm) et n'a aucun effet sur *Escherichia coli* et *Ps. aeruginosa*. Alors que la mycotine n'a aucune activité sur les souches bactériennes testées. En revanche, la mycocide a une très forte activité inhibitrice sur *Saccharomyces cerevisiae* (33 mm) et légèrement inhibitrice sur *Candida albicans* (12 mm), par contre la mycotine a montré une activité fortement inhibitrice sur les deux levures testées.

Donc, il faut dire que la mycocide agit sur les bactéries Gram + mais n'a aucun effet sur les Gram –, de plus, elle a une activité antifongique par contre la mycotine n'a seulement qu'une activité antifongique (**Fig. 45**).

La sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens a été classifiée par le diamètre de la zone d'inhibition comme suit [143] :

- Extrêmement sensible: $D \geq 20 \text{ mm}$
- Sensible: $15 \text{ mm} \leq D \leq 19 \text{ mm}$
- Intermédiairement sensible: $9 \text{ mm} \leq D \leq 14 \text{ mm}$
- Non sensible (résistante): $D < 8 \text{ mm}$

Pour les souches *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecalis*, les diamètres des zones d'inhibitions sont élevés ($D > 28\text{mm}$), elles sont extrêmement sensible envers tous les produits testés, à l'exception de *Enterococcus faecalis* qui est intermédiairement sensibles à la mycocide. Par contre, il est remarqué que *E.coli* s'est montré extrêmement sensible seulement à l'HE, au thymol et aux deux pâtes préparées ($D > 26 \text{ mm}$). La souche qui s'est révélée intermédiairement sensible à l'HE et au thymol est *Ps. aeruginosa* mais elle est extrêmement sensible aux deux pâtes formulées.

En ce qui concerne les levures, *Saccharomyces cerevisiae* apparaît plus sensible à tous les produits testés que *Candida albicans*.

Saccharomyces cerevisiae possède un potentiel de sensibilité très élevé vis-à-vis de l'HE et des deux pâtes formulées ($D > 60\text{mm}$), alors qu le diamètre de la zone d'inhibition de cette souche est de 45 mm sous l'effet de thymol extrait. Ces résultats montrent que *Saccharomyces cereviceae* présente une sensibilité relativement moins élevée au thymol comparativement à l'HE et aux deux pâtes. En revanche, cette souche présente aussi une

forte sensibilité aux pommades commerciales (mycocide et mycotine), sensibilité qui est moins élevée que celle manifestée contre les pâtes préparées.

L'action des deux pâtes formulées vis-à-vis de *C. albicans* a montré des diamètres des zones d'inhibitions très importants, dépassant les 50 mm. Donc elle manifeste une sensibilité très élevée vis-à-vis de ces deux pâtes comparée à celle obtenue vis-à-vis de l'HE (D = 47mm) et de thymol (26 mm). Elle présente une sensibilité moyenne vis-à-vis de la mycotine et mycocide avec un diamètre d'inhibition de 21.5 mm et 12 mm respectivement.

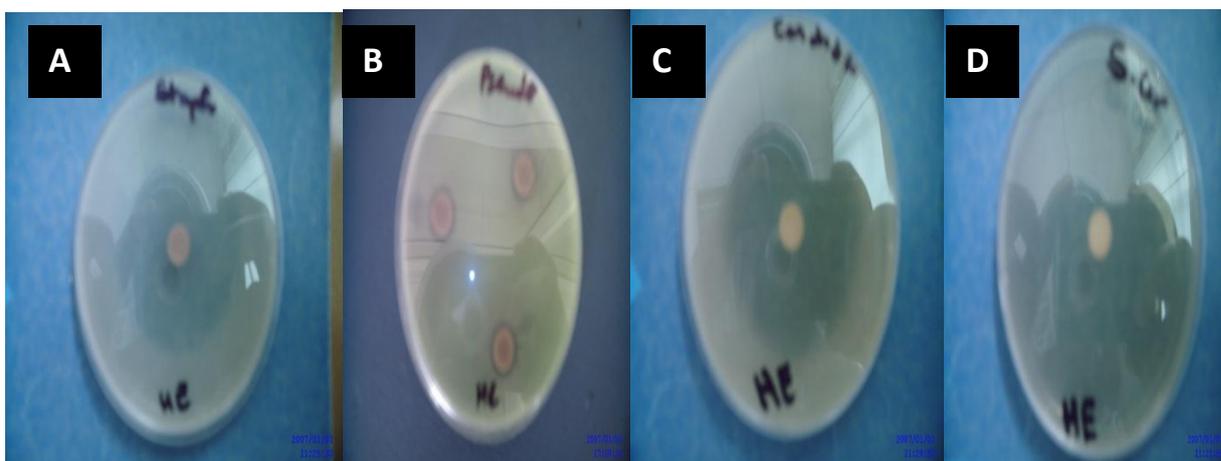


Fig.41: Activité antibactérienne et antifongique de l'HE de *T.fontanesii* sur: A. *S. aureus*, B. *Ps. Aeruginosa*, C. *C. albicans*, D. *Sa. Cereviceae*

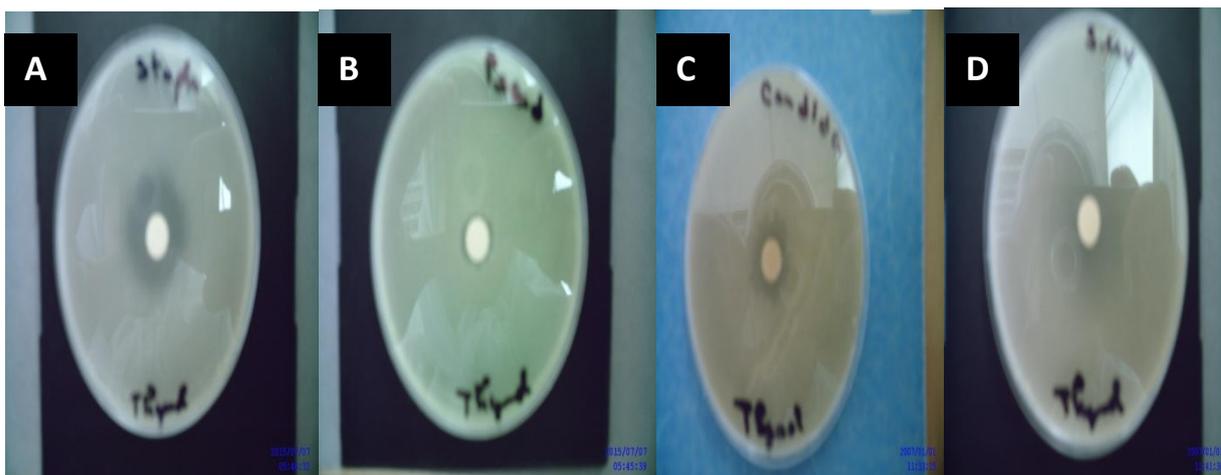


Fig.42: Activité antibactérienne et antifongique de thymol extrait sur: A. *S. aureus*, B. *Ps. Aeruginosa*, C. *C. albicans*, D. *Sa. cereviceae*

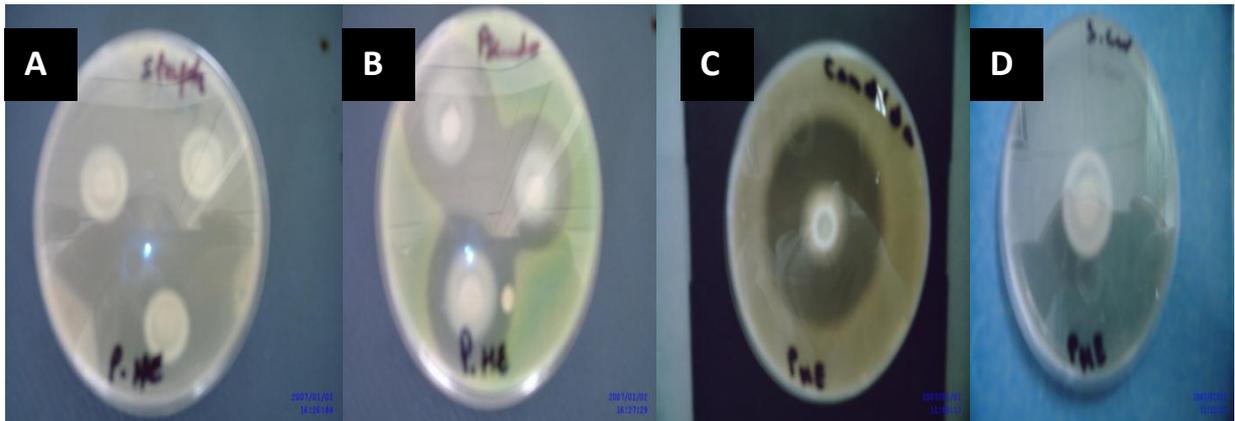


Fig.43: Activité antibactérienne et antifongique de la pâte à base d'HE sur: A. *S. aureus*, B. *Ps. aeruginosa*, C. *C. albicans*, D. *Sa. cereviceae*

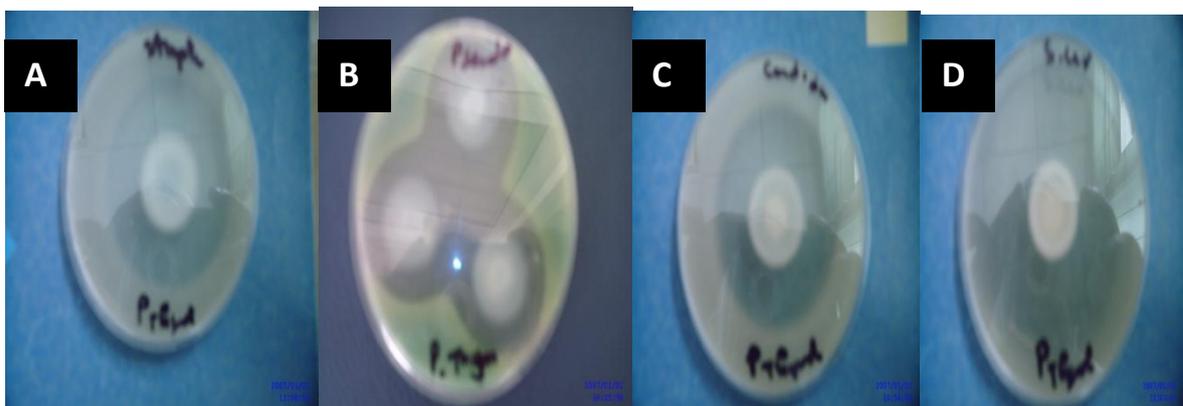


Fig. 44: Activité antibactérienne et antifongique de la pâte à base de thymol sur: A. *S. aureus*, B. *Ps. Aeruginosa*, C. *C. albicans*, D. *Sa. cereviceae*

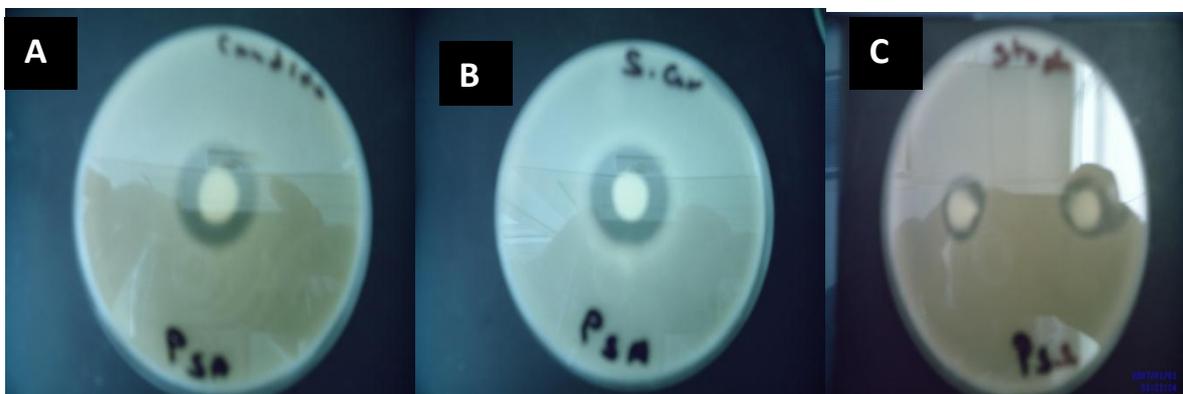


Fig. 45: Activité antifongique de la mycotine sur: A. *C. albicans*, B. *Sa. Cereviceae* et l'activité antibactérienne de la mycotinide sur *S. aureus* (C)

V.5.2 Pour les dermatophytes

Le diamètre de la zone d'inhibition observée autour des disques imprégnés d'HE pure, d'eau distillée, de la pâte formulée et de la pommade commercialisée (terbinafine) après 5 jours d'incubation à 26°C, ainsi que le pourcentage d'inhibition calculé à partir de la formule sus-indiquée sont résumés dans le **tableau 30**.

Tableau 30: Valeurs des diamètres de la zone d'inhibition et le % d'inhibition de l'HE pure, de la pâte formulée et de la pommade de Terbinafine.

	<i>T. mentagrophytes</i>		<i>M. canis</i>	
	Diamètre d'inhibition	% d'inhibition	Diamètre d'inhibition	% d'inhibition
Eau distillée	00 mm	00 %	00 mm	00 %
HE pure	90 mm*	100 %	90 mm*	100 %
	90 mm*	100 %	90 mm*	100 %
	90 mm*	100 %	90 mm*	100 %
Pâte d'HE formulée	90 mm*	100 %	90 mm*	100 %
	90 mm*	100 %	90 mm*	100 %
	90 mm*	100 %	90 mm*	100 %
Terbinafine	71.30 mm	79.22 %	60.98 mm	67.76 %
	77.52 mm	86.13 %	55.55 mm	61.72 %
	75.20 mm	83.55 %	51.50 mm	57.22 %

* 90 mm correspondent au diamètre de la boîte de pétri

Au vue du tableau, il est observé une activité fortement inhibitrice de nos produits (HE de *Thymus fontanesii* et pâte formulée) sur la croissance des 2 souches fongiques testées, ce qui justifie l'apport de l'HE de thym à coté des autres constituants de la pâte formulée comme agent antifongique. L'utilisation courante de la Terbinafine comme agent antifongique justifie son choix comme témoin positif dans notre étude.

L'HE de thym et la pâte formulée inhibent à 100% la croissance de *M. canis* et *T. mentagrophytes*, par contre la Terbinafine l'inhibe à 70 % en moyenne dans les mêmes conditions opératoires (**Fig.46,47**).

Les deux souches présentent le même diamètre d'inhibition (90 mm) et le même taux d'inhibition (100%) pour l'HE de thym et la pâte formulée. En ce qui concerne la Terbinafine, la plus haute sensibilité a été observée avec *T. mentagrophytes* dont le diamètre moyen d'inhibition est de 74.67 mm contre 56.01 mm pour *M.canis* (Fig.46,47).

Cette étude qualitative de l'activité antimicrobienne de ces produits testés s'est avérée très intéressante, du fait qu'il a obtenu des résultats satisfaisants. D'après résultats obtenus, il faut dire que l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, son thymol extrait et les deux pâtes préparées possèdent une activité antibactérienne et antifongique très importante, dans laquelle certaines souches semblent se distinguer par une sensibilité très élevée par rapport aux autres.

D'une façon générale, ce que l'on peut dire, c'est que la pâte à base d'HE à une meilleure activité antimicrobienne par rapport aux autres produits testés.

Ce test préliminaire n'est qu'un criblage des activités antimicrobiennes de nos produits, il nous permet de sélectionner pour chaque souche utilisée le produit, qui a présenté le plus d'activité antimicrobienne parmi l'ensemble des produits testés. Les résultats de cette étude qualitative méritent une étude quantitative plus approfondie pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) et/ou fongicide (CMF) de notre HE. C'est aussi un test préliminaire pour d'autres tests pharmacologiques complémentaires à notre pâte formulée à base d'HE de *T. fontanesii*.

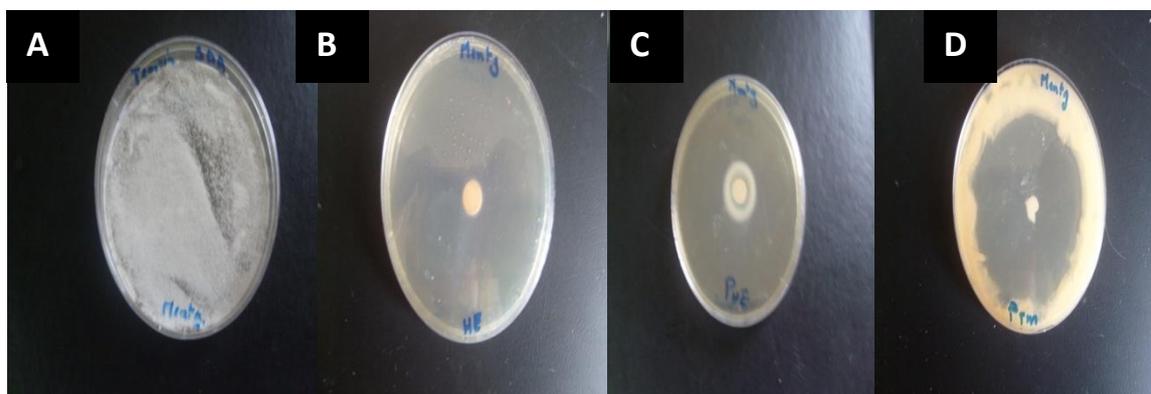


Fig.46: Activité antifongique de: B. HE de *T. fontanesii*, C. pâte à base HE de *T. fontanesii*, D. pommade à base de Terbinafine (mg) sur *T.mentagrophyte* (A. temoin)

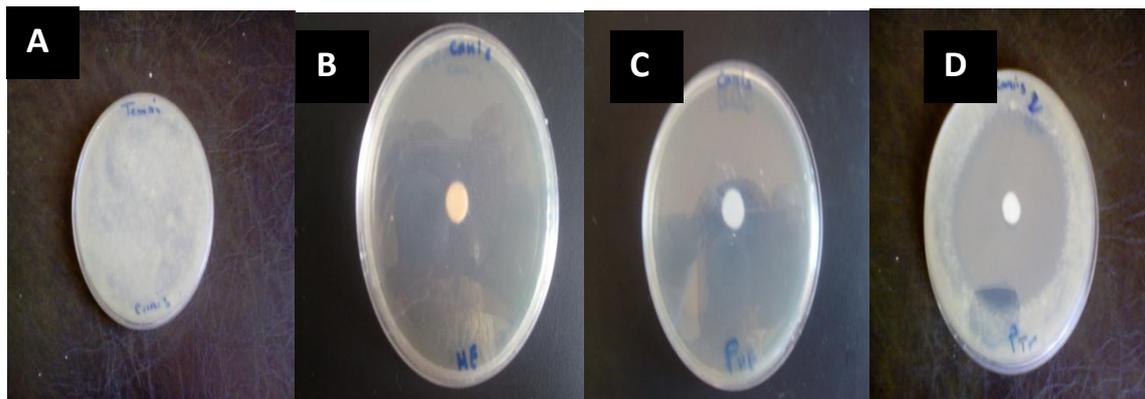


Fig. 47: Activité antifongique de: B. HE de *T. fontanesii*, C. pâte à base HE de *T. fontanesii*, D. pommade à base de Terbinafine(mg) sur *M.canis* (A. témoin)

V.6 Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Thymus fontanesii*

V.6.1 Pour les bactéries et les levures

Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de *T. fontanesii* sont consignés dans le tableau 31.

Tableau 31: aromatoigramme de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Souche	Témoin	0.03%	0.06%	0.125%	0.25%	0.5%	1%	2%
Gram +								
Staphylococcus aureus	+++	+	-	-	-	-	-	-
Bacillus subtilis	+++	+	+	-	-	-	-	-
Enterococcus faecium	+++	+	+/-	-	-	-	-	-
Gram -								
Escherichia coli	+++	+	+	+/-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	+++	+	+	+	+	+/-	-	-
Levures								
Candida albicans	+++	+	+	+/-	-	-	-	-
Saccharomyces cerevisiae	+++	+	+	-	-	-	-	-

+ : présence de germe

- : absence de germe

Tableau 32: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB) d'HE de *Thymus fontanesii* relatives aux bactéries testées

Souche	CMI	CMB
Gram +		
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.06%	0.06%
<i>Bacillus subtilis</i>	0.125%	0.125%
<i>Enterococcus faecium</i>	0.125%	0.25%
Gram -		
<i>Escherichia coli</i>	0.25%	0.25%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1%	1%

Tableau 33: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentration minimale fongicides (CMF) d'HE de *Thymus fontanesii* relatives aux levures testées

Souche	CMI	CMF
<i>Candida albicans</i>	0.25%	0.5%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.125%	0.25%

L'huile essentielle de *T. fontanesii* a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries et des levures testées, sauf la *Ps. aeruginosa* qui se révèle un peu résistante, et cela malgré l'utilisation du Tween 80 qui abaisse considérablement l'activité antimicrobienne des huiles essentielles [23]. Ainsi, *S. aureus* s'est montré le plus sensible, il a été inhibé à partir de la concentration minimale de 0.06% (v/v). La concentration de 0.125% (v/v) a été suffisante pour arrêter la croissance de *B. subtilis* et de *E. faecium*. Tandis que *E. coli* a été inhibé à partir de la concentration minimale de 0.25% (v/v), alors que *Ps. aeruginosa* a résisté jusqu'à la concentration en huile essentielle de 1% (v/v).

Les levures ont montré une grande sensibilité à l'HE de *T. fontanesii*. Une concentration de 0.125% (v/v) d'HE était suffisante pour inhiber la croissance de *Sa. cerevisiae*, alors que *C. albicans* a manifesté une résistance jusqu'à la concentration de 0.25% (v/v).

En effet, toutes les souches bactériennes et levuriennes utilisées se sont inhibées à une concentration comprise entre 0.06% et 1% (v/v).

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI, ont permis d'observer les concentrations minimales bactéricides (CMB) sur les 5 bactéries et les concentrations minimales fongicides (CMF) sur les deux levures testées.

La concentration minimale bactéricide et/ou fongicide est souvent égale ou plus élevée que la CMI. Sur toutes les bactéries testées, les valeurs de CMB sont superposables aux valeurs de CMI à l'exception de *E. faecium* où la CMB est égale au double de la CMI. En revanche, il faut au moins le double de la CMI pour obtenir l'effet fongicide sur les deux levures étudiées.

Les CMB déterminés ont varié aussi de 0.06% à 1% (v/v). Parmi les bactéries testées, la souche *S.aureus* s'est montrée la plus sensible (CMB=0.06% (v/v)), tandis que *Ps. aeruginosa* était la plus résistante avec la plus haute CMB (1% (v/v)). L'HE de *T.fontanesii* présente la meilleure activité fongicide sur *Sa. cereviseae* (0.25%(v/v)).

Malgré les variations des CMI et CMB et/ou CMF d'un microorganisme à un autre, dans certains cas elles sont égales indiquant ainsi une forte action bactéricide et fongicide. En effet, lorsque le rapport CMB/CMI (CMF/CMI) est inférieur ou égal à 4, l'HE est bactéricide et/ou fongicide. Quand ce rapport est supérieur à 4, l'HE est dite bactériostatique et /ou fongistatique [144]. Le tableau 34 présente les différents rapports CMB/CMI, CMF/CMI.

Tableau 34: Rapport CMB/CMI, CMF/CMI de différentes souches utilisées vis-à-vis d'HE de *T. fontanesii*

Souches	CMB/CMI	Interprétation
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	Bactéricide
<i>Bacillus subtilis</i>	1	Bactéricide
<i>Enterococcus faecium</i>	2	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	1	Bactéricide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	Bactéricide
<i>Candida albicans</i>	2	Fongicide
<i>Saccharomyces cereviseae</i>	2	Fongicide

D'après le tableau 34, il faut dire que l'huile essentielle testée a un pouvoir bactéricide et/ou fongicide sur toutes les souches utilisées. Donc, l'HE de *T. fontanesii* a révélé, à la fois, une forte activité bactéricide et fongicide. Ce qui explique leur application aux produits pharmaceutiques.

V.6.2 Pour les dermatophytes

Il est rapporté dans le tableau 35 les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales fongicides (CMF) de l'HE de *Thymus fontanesii* obtenues par les deux méthodes de macrodilution en milieu solide et en milieu liquide.

Tableau 35: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales fongicides (CMF) d'HE de *Thymus fontanesii* vis-à-vis des deux dermatophytes testées

Souches	En milieu Solide		En milieu Liquide	
	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>M. canis</i>	0.06%	0.125%	0.06%	0.06%
<i>T. mentagrophytes</i>	0.005%	0.01%	0.01%	0.01%

L'analyse des résultats relatifs à la croissance des dermatophytes soumis à l'action de différentes concentrations d'huile essentielle de thym testées (Tableau 35) il permet de constater que l'HE de thym exerce une forte action fongitoxique sur les deux dermatophytes testés à des concentrations allant de 0.005 à 2%. En effet, à une concentration égale ou supérieure à 0.005%, l'HE de thym inhibe la croissance de *T. mentagrophytes*, tandis que la croissance de *M. canis*, elle est inhibée à une concentration égale ou supérieure à 0.06%. (Fig.48,49). Entre 0,001 et 2 %, le taux d'inhibition de la croissance fongique est proportionnel à la concentration des huiles essentielles dans l'environnement par rapport aux deux souches fongiques testées.

Concernant la concentration minimale fongicide, elle est souvent égale ou plus élevée que la CMI. Pour notre HE, il faut au moins le double de la CMI pour obtenir l'effet fongicide sur les deux dermatophytes testés par la méthode de disque. Tandis que, avec la méthode de dilution liquide, la même CMI a coïncidé avec la CMF (Fig.48,49)

L'étude de la sensibilité des champignons soumis aux deux méthodes, l'une par contact direct en milieu gélosé solide et l'autre par contact direct en milieu liquide, a clairement montré des différences entre les deux méthodes d'essai appliquées. Les CMF obtenues par la technique des disques sont plus élevées par rapport à celles obtenues par dilution sur bouillon. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'en milieu liquide la surface de contact entre le microorganisme et la substance active est grande. Par ailleurs, la lecture des résultats dans la méthode des disques est plus facile mais la technique nécessite encore des études sur de grandes séries de dermatophytes pour déterminer la corrélation

exacte entre les CMI et le diamètre de l'auréole d'inhibition autour des disques imprégnés d'antifongiques.

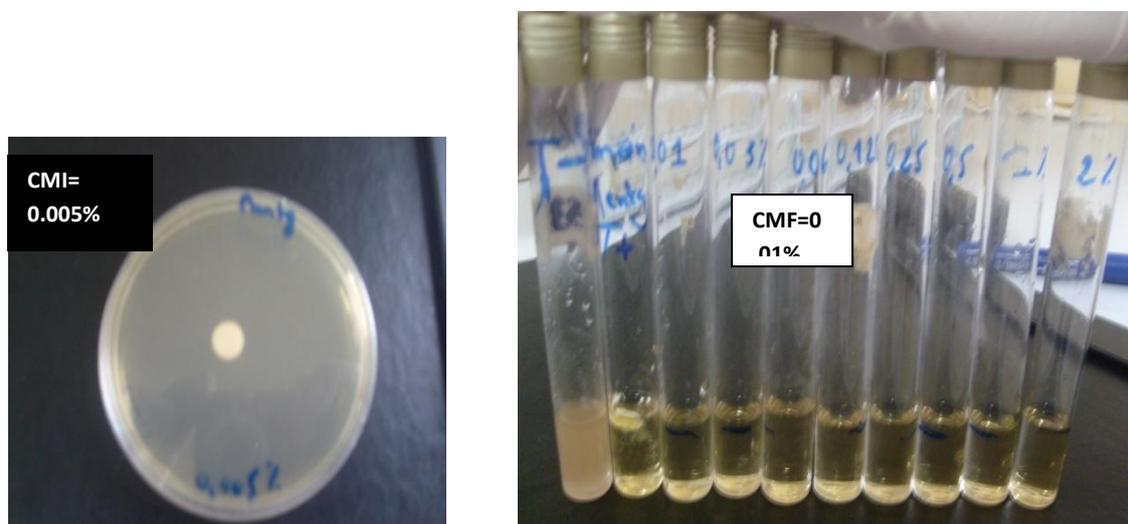


Fig.48 CMI de l'HE de *Thymus fontanesii* sur *T. mentagrophyte* par la méthode de disque et CMF par la méthode de dilution liquide

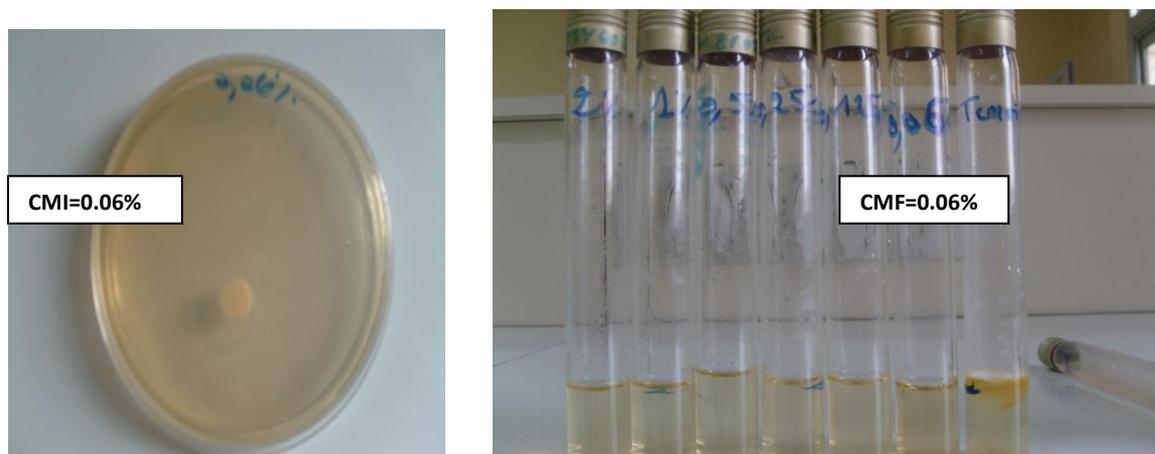


Fig. 49 CMI de l'HE de *Thymus fontanesii* sur *M. canis* par la méthode de disque et de micropuit et CMF par la méthode de dilution liquide

V.7 Discussion

L'accroissement des infections microbiennes, couplées à l'insuffisance en médicaments efficaces, nous a conduits à nous intéresser à l'inépuisable source de produits naturels à vertu thérapeutique : les plantes médicinales. A côté des médicaments synthétiques prescrits dans le traitement des infections microbiennes, de nombreux produits naturels ont été testés dans le but de trouver un agent antimicrobien efficace, sans effet néfaste pour l'organisme et moins coûteux.

C'est selon cette optique que l'HE de thym a été étudiée afin de déterminer un agent antimicrobien efficace contre la croissance de bactéries, de levures et de dermatophytes. Ainsi les résultats émanant des tests d'inhibition des souches microbiennes utilisées montrent que nos produits testés présentent tous, à la fois, une activité antifongique et antibactérienne. Concernant la pâte à base d'HE, nous remarquons que cette dernière a une activité fongicide et bactéricide plus prononcée.

L'action antimicrobienne des huiles essentielles de thym, n'est plus à démontrer. Plusieurs travaux ont été réalisés pour l'étude de l'activité de ces huiles sur les bactéries, les levures et les moisissures [25,88,90,131]. Cependant rares sont ceux qui ont été consacrés à leur activité contre les dermatophytes responsables de multiples mycoses humaines.

Parmi les études qui ont pour objet la détermination du pouvoir antimicrobien des HES de certaines espèces de thym, celles de [63,71,88,89,145,25].

Par ailleurs, il est comparé l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle provenant de notre espèce avec d'autres provenant de diverses régions de l'Algérie. Les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés dans le **tableau 36**.

Tableau 36: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) trouvé dans la littérature

	T.algeriensis (a)	T.pallescens (b)	T.algeriensis (c)	T.pallescens (d)	T.fontanesii (d)
Bactéries Gram +					
<i>Staphylococcus aureus</i>	35.66	69.33	R	27.83	58.50
<i>Bacillus subtilis</i>	35.66	38.33	42.00	---	43.33
<i>Enterococcus faecium</i>	21.33	36.33	---	34.17	33.16
Bactéries Gram -					
<i>Escherichia coli</i>	22.66	46.33	R	35.17	37.33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	16.33	R	15.83	13.33
Levures					
<i>Candida albicans</i>	42.33	57.66	32.00	42.33	47.00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27.00	73.00	46.00	42.67	60.75
Dermatophyte					
<i>M. canis</i>	---	---	---	---	90*
<i>T. mentagrophytes</i>	---	---	---	---	90*

a: Hammoum et Kerbouche (2007) [146]. **b :**Hammoum et Kerbouche (2007) [146]. **c:** Dob et al.(2006) [66]. **d:** Bousbia (2004) [147]. **e:** Notre huile

*: diamètre de la boîte pétri.R: souche résistante. --- souche non testée

D'après le tableau 36, il est constaté une nette différence entre les résultats trouvés dans la littérature et les nôtres. Cette différence d'activité semble être due à la présence du thymol et du carvacrol qui sont majoritaires dans notre huile (thymol 33.60%, carvacrol 27.17%), et celle de *T. pallescens* (carvacrol 57.7%), en revanche, l'huile essentielle de *T. algeriensis* d'El Asnam est de type chimique à 4-terpineol (10.60%) et celle de Médéa à chimiotype linalool (47.30%).

Des aromagrammes ont été réalisés avec différentes espèces endémiques de thym portugais, dont les composés majoritaires sont le linalool et le 1,8-cinéol. Les diamètres d'inhibition (pour 3 µl d'huiles essentielles) varient entre 0.6 cm (le diamètre du disque) et 1.5 cm pour l'espèce la plus active. Ces résultats montrent que la présence de phénols, thymol et/ou carvacrol, augmente drastiquement l'activité des huiles essentielles de même espèce pour une même souche [148].

Comme cela a été rapporté dans la littérature [142], il est considéré qu'une huile essentielle à une très forte activité inhibitrice si son diamètre d'inhibition est supérieur à 30 mm. Notre HE agit de façon très active sur l'ensemble des souches utilisées surtout sur les dermatophytes dont elle s'est révélée active à 100%. Il est remarqué aussi, que *Pseudomonas aeruginosa* s'est montré peu sensible à l'action d'HE de *T. fontanesii* par rapport aux autres bactéries étudiées. Cette résistance de *Ps. aeruginosa* n'est pas surprenante, elle est due à la nature de sa membrane externe qui lui confère la résistance à la plupart des agents biocides [55]. Nos résultats concordent avec les travaux de [11,63,64,71,149,150,151]. Par contre, *Staphylococcus aureus*, se révèle très sensible. Cette sensibilité accrue est confirmée par les résultats de [128,152].

L'évaluation de l'activité inhibitrice des huiles essentielles a révélé que leurs taux d'inhibition varient selon plusieurs facteurs, dont la nature et la concentration de l'huile essentielle ainsi que de la souche microbienne utilisée. Ainsi, les différences observées entre les activités antimicrobiennes des huiles essentielles peuvent être attribuées aux variations de leurs fractions actives et aux multiples méthodes utilisées [153].

L'évaluation quantitative de l'activité d'HE de *T. fontanesii* par la méthode de dilution en milieu solide, a révélé l'inhibition de croissance des colonies des souches bactériennes et levuriformes et des filaments des souches filamenteuses. Cette activité montre un profil variable sur toutes les souches utilisées, ce qui se traduit par des concentrations d'inhibition différentes et donc une différence de sensibilité de ces souches vis-à-vis de cette huile essentielle.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la plus faible concentration d'HE à laquelle aucune croissance n'est visible à l'oeil. Ainsi, la CMB est définie par la plus faible concentration ayant donnée 100% de bactéries non viables [112]. Toutes les souches se sont inhibées à une concentration comprise entre 0.01% et 1% (v/v). Donc l'activité de notre HE a été remarquable surtout sur les dermatophytes dont la CMI est de 0.005% à 0.06%. Les levures sont également sensibles à l'HE mais avec des CMI plus importantes atteignant 0.25% (v/v) pour *Candida*.

La présente étude a démontré également que la CMB et la CMF peuvent être égales ou supérieures à la CMI. Généralement, l'activité fongicide est obtenue à partir du double de la CMI pour les levures et les dermatophytes utilisées (dilution en milieu solide), alors qu'avec la même CMI il obtient l'effet bactéricide sur la plupart des bactéries testées, notamment avec la souche la plus résistante (*Ps. aeruginosa*). Ceci indique que notre huile essentielle de *T. fontanesii* est fortement bactéricide et fongicide vis-à-vis des bactéries et des champignons utilisés.

Les valeurs de CMI et de CMF obtenues avec cette HE sur les dermatophytes sont aussi basses que celles déjà obtenues avec la même huile vis-à-vis des levures et des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Toutefois il faut souligner qu'il existe une sensibilité différentielle des bactéries, des levures et des dermatophytes testées vis-à-vis de l'HE de *T. fontanesii*. En effet, les levures sont moins sensibles que les dermatophytes. Ce qui est en accord avec ceux rapportés par **Ouraini et al.,(2005) [131]**. La plupart des bactéries possèdent des sensibilités intermédiaires entre les levures et les dermatophytes utilisées. Cette différence ne peut être expliquée que par la différenciation structurale de la paroi de ces différentes catégories de souches.

Donc, dans cette étude, il est constaté une sensibilité différente selon la nature des souches étudiées. Ces résultats sont en accord avec ceux du screening publiés par **Pinto et al., (2006) [88]** ainsi que ceux de **Maksimovic et al. (2008) [89]** pour d'autres variétés de thym.

En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis à vis des HES. Ces résultats sont confirmés par de nombreuses expériences [97,154] qui ont montré que les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries et parmi les bactéries, les Gram – apparaissent plus résistants que les Gram + vis-à-vis des HES.

L'analyse du **tableau 33** montre que les CMI et les CMB des bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*.) vis-à-vis de l'HE sont légèrement supérieures à celles des bactéries à Gram positif (*B. subtilis*). Cette différence ne peut être expliquée que par la diversité structurale de la paroi de ces différentes catégories de bactéries. Ainsi donc, et d'après les résultats trouvés il faut dire que les bactéries Gram + sont plus sensibles que les Gram -, ce qui est en accord avec les travaux de [37,63,151,155]. La faible sensibilité des bactéries Gram - est expliquée par la présence d'une seconde membrane lipopolysaccharidique jouant un rôle de barrière vis-à-vis des huiles essentielles [156]. Certains auteurs ont rapporté que les bactéries à Gram positif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram- [49]. Cette affirmation n'a cependant pas été confirmée par d'autres travaux. La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram [7, 25,89].

En général, les bactéries Gram - sont plus résistantes que les Gram + et ceci semble être dû à la différence de structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane externe des Gram - est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que celle des Gram + qui les rend plus hydrophiles, ce qui empêche les terpènes (HE) hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable [7]. Ce qui explique l'activité élevée de thymol sur *Ps. Aeruginosa* par rapport celle de l'HE.

L'huile de *T. fontanesii* a exercé une forte activité bactéricide et fongicide contre toutes les bactéries et tous les champignons testés. Ce grand pouvoir bioactif observé est attribué principalement à leurs teneurs élevées en phénols terpéniques (thymol 33.6%, carvacrol 27.17%). Différents travaux ont montré que les HE de différentes espèces de thym dont le composé majoritaire est de nature phénolique, ont un large spectre d'inhibition, comprenant des bactéries à Gram positif, et à Gram négatif, des levures et même des moisissures et des champignons filamenteux. [15,25,63,71,88].

Cependant, **Ajjour et al. (2008) [145]** ont noté que l'huile essentielle de *T. bleicherianus* est dotée d'une activité fongicide légèrement supérieure à celle de *T. capitatus*. Ceci peut être attribué au fait que l'huile de *T. bleicherianus* compte parmi ses principaux constituants le thymol alors que *T. capitatus* est dominée par le carvacrol. En effet, Dorman et al. (2000) [7] ont testé un grand nombre de constituants purs des huiles

essentielles contre 25 genres différents de bactéries et ils ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne suivi du carvacrol et de l' α -terpineol.

Ces mêmes auteurs ont expliqué la différence de l'efficacité antimicrobienne observée entre le thymol et le carvacrol par la position du groupement hydroxyle sur la structure phénolique des deux molécules.

Pour vérifier si l'effet antimicrobien de notre HE est lié seulement aux composés majoritaires ou si c'est une synergie entre tous les constituants de l'huile essentielle, même les minoritaires, nous avons alors choisi de tester l'activité antimicrobienne d'un composé phénolique pur: le thymol, composé majoritaire de *T. fontanesii*.

Le choix de travailler uniquement avec le thymol est en accord avec la littérature où beaucoup de travaux ont souligné l'efficacité antifongique et antibactérienne des phénols terpéniques et plus particulièrement celle du thymol et/ou du carvacrol [7,63,149,150].

Les résultats des degrés d'efficacité d'HE et de thymol extrait sur les microorganismes ont montré que l'essence pure est plus active que leurs composés majoritaires à l'exception de *Ps.aeruginosa*. Ceci peut être expliqué par la structure moléculaire qui semble présenter un rôle aussi important que la présence d'oxygène dans la molécule de thymol. La caractéristique lipophile du squelette hydrocarboné ainsi que la propriété hydrophile des groupes fonctionnels sont déterminants vis-à-vis de l'activité antimicrobienne des tetrpénoïdes [157]. De façon plus précise, dans les phénols, la présence de groupe hydroxyle apparaît déterminante [158,159]. Enfin, dans les hydrocarbones, la structure cyclique semble avoir un rôle important sur leur activité antimicrobienne [154].

D'une façon générale, ce que l'on peut dire, c'est que l'HE du thym a une meilleure activité antimicrobienne par rapport à celle de thymol pur. Cette dominance d'activité d'HE sur celle d'un composant majoritaire confirme bien l'effet de synergie que pourraient apporter les composants minoritaires à l'activité d'HE. L'efficacité antibactérienne et antifongique de l'essence de *T. fontanesii* par rapport à celle de thymol extrait peut être due aussi à l'activité synergique entre le thymol et le carvacrol. Ces composés sont présents dans l'huile de *T. fontanesii* avec des taux respectifs de 33.60 % et 27.17 %.

La synergie entre ces deux phénols a été constatée dans plusieurs études [32,145]. Selon ces observations, il est affirmé que la forte activité antifongique observée chez l'huile essentielle de notre espèce de thym peut être attribuée seulement au thymol et au carvacrol, comme elle peut être le résultat de synergies entre les différents constituants de cette huile.

Cependant, il est probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique [18].

Ces résultats corroborent ceux d'autres recherches qui ont montré que l'activité antimicrobienne d'huiles essentielle de thym est supérieure à celle de son composé majoritaire (thymol) testé séparément [7,160,161]. Cette dominance d'activité d'HE sur celle d'un composant majoritaire peut être expliquée par le fait que les autres composés présents en trace possèdent un rôle important en augmentant le pouvoir antimicrobien de l'huile grâce à leurs activités synergiques avec les composés majeurs [112,162]. Donc, des phénomènes de synergie entre les différents constituants peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible par les composés majoritaires [6].

Les résultats obtenus ne concordent pas avec ceux trouvés par **Klaric et al. (2006) [90]** qui ont démontré que le thymol, le constituant majeur des HES de thym (*T. vulgaris* et *T. pugeloides*), avait une activité significativement plus forte que l'HE de *T. vulgaris* sur l'ensemble des souches testées. Ils ont constaté que le thymol avait une activité inhibitrice trois fois plus forte que l'HE de thym prise dans son ensemble. Cette activité plus importante de thymol seul (extrait cette fois de *Thymus pulegioides*) a également été observée sur différentes souches de *Candida* ainsi que sur d'autres souches de dermatophytes [88]. Cette faible activité antimicrobienne de l'huile essentielle peut s'expliquer par l'existence des phénomènes d'antagonisme entre les différents composants de l'essence naturelle. Cependant une étude menée par **Lambert, Skandamis et al., (2001) [163]** ne corrobore pas les effets de synergie mentionnés entre le thymol et le carvacrol.

La présente étude montre que les composés correspondant aux produits majoritaires des HE ne sont pas nécessairement plus efficaces que les huiles elles-mêmes. Cependant, il existe certainement des phénomènes de synergie ou d'antagonisme entre les différents composants de l'essence naturelle.

Il faut déduire aussi que le principe actif des HE réside dans leurs constituants majoritaires et que la sensibilité des souches vis-à-vis d'une HE donnée diffère donc selon l'espèce, comme elle peut varier selon d'autres critères. Par exemple, la méthode d'étude utilisée. Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE sont différentes et peuvent donner des résultats différents d'une technique à l'autre [49,99,131,155,164,165]. Ces constatations démontrent la difficulté de comparer les résultats publiés à l'heure actuelle.

Conclusion Générale

CONCLUSION GENERALE

Il a été procédé l'activité antimicrobienne de deux pâtes pharmaceutiques l'une à base de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et l'autre à base de son thymol extrait. Cette activité a été évaluée sur des bactéries, des levures et des dermatophytes responsables de mycoses humaines.

De la première partie de cette étude nous pouvons déduire les conclusions suivantes:

- La cinétique d'extraction d'HE de *T. fontanesii* à différentes périodes de la cueillette a montré que le meilleur rendement a été obtenu à la fin de la floraison (juillet/août) de la plante avec 3.9%.

- Il apparaît ainsi une influence du cycle végétatif, non seulement sur le rendement en HE, mais aussi sur le profil chimique de celle-ci. L'analyse par CPG/SM des HES de thym nous a permis de constater que les HES analysées étaient caractérisées par une importante fraction monoterpénique et par la prédominance de composés phénoliques (thymol, carvacrol).

- Le thymol reste toujours le constituant principal des HES sa plus forte proportion a été obtenue en début de floraison (77.72%).

- L'analyse des différentes fractions de l'HE de *T. fontanesii* obtenues par entraînement à la vapeur d'eau nous a permis de mettre en évidence une évolution dans sa composition chimique durant l'extraction. D'après cette étude, nous constatons que les composants monoterpéniques sont plus volatils que les sésquiterpéniques, ceci est dû à leurs faibles poids moléculaires.

- L'étude comparative entre l'HD et l'EVE nous a permis de constater:

- ✓ Une grande similitude des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques.
- ✓ D'un point de vue quantitatif, l'extraction par HD permet l'obtention d'une HE avec un rendement supérieur à celui obtenu par EVE (respectivement 3.4% et 3.2%).
- ✓ D'un point de vue quantitatif, l'HD est incontestablement une méthode de choix. L'HE obtenue par EVE est beaucoup plus riche en composés sésquiterpéniques, alors que la teneur la plus haute en monoterpènes phénoliques a été obtenue par l'HD. Le thymol est, dans tous les cas, le constituant majeur avec une teneur de 77.72% en HD et 44.31% en EVE. Le carvacrol n'est présent qu'à un taux de 13.27% en HD et 34.983% en EVE.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces études nous a permis de retenir la méthode d'hydrodistillation comme étant la plus adaptée pour la suite de nos travaux. En effet, c'est un procédé simple à mettre en œuvre, beaucoup plus efficace et donne une huile essentielle plus riche et plus concentrée en thymol.

La deuxième étape de notre travail consistait à extraire le thymol selon deux méthodes d'extractions sélectives (extraction à froid et extraction chimique), et pour vérifier si l'effet antimicrobien de notre HE est lié seulement au composé majoritaire de celle-ci, nous avons alors choisi de tester l'activité antimicrobienne de son thymol extrait et comparé à celle de l'HE de *Thymus fontanesii* totale. Donc, dans la deuxième partie de notre étude nous pouvons ressortir les points suivants:

- L'HE de *Thymus fontanesii* et son thymol extrait ont une forte activité inhibitrice sur toutes les souches bactériennes et levuriformes testées, mais l'HE du thym présente une meilleure activité antimicrobienne par rapport à celle de thymol pur. Cette prédominance de l'activité d'HE sur celle d'un composant majoritaire confirme bien l'effet de synergie que pourraient apporter les composants minoritaires à l'activité d'HE.

- L'étude qualitative et quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de notre *T. fontanesii* s'est avérée très intéressante, du fait que nous avons obtenu des résultats positifs sur toutes les souches utilisées. En effet, cette huile essentielle a exercé une forte activité bactéricide et fongicide contre toutes les bactéries et les champignons testés.

En se basant sur ces propriétés, nous avons préparé deux mêmes formulations antimicrobiennes dont l'une à base de l'huile essentielle et l'autre à base de thymol extrait.

- La soumission de nos pâtes à différents tests de qualité (homogénéité, pH) a montré qu'elles sont conformes aux normes pharmaceutiques.

- L'essai de tolérance locale effectué sur des lapins albinos nous a permis de classer notre pâte à base d'HE comme non irritante (IP = 0.29) tandis que celle à base de thymol est considérée comme un produit à action légèrement irritante pour la peau (IP = 0.70). Les résultats obtenus montrent la bonne tolérance locale de nos pâtes formulées chez l'animal.

- L'étude antimicrobienne des pâtes préparées nous a permis de constater qu'elles ont une très forte activité inhibitrice sur toutes les souches utilisées. Elles ont un large spectre d'action dont les valeurs moyennes de la zone d'inhibition ont été dépassées 37 mm et 50 mm respectivement contre les bactéries et les levures testées. Ainsi, notre pâte à base d'HE inhibe à 100% la croissance des souches dermatophytiques utilisées.

L'ensemble des résultats microbiologiques obtenus au cours de cette étude nous a permis de montrer que tous les produits testés possèdent une activité antifongique et antibactérienne très importante, dans laquelle certaines souches semblent se distinguer par une sensibilité très élevée par rapport aux autres,. Concernant la pâte à base d'HE nous remarquons qu'elle a une activité antimicrobienne très prononcée. Elle exerce un haut effet antifongique sur la croissance des dermatophytes testés *in vitro*.

Nous avons conclu donc que la formulation à base de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* peut être utilisée en qualité d'antimicrobienne efficace dans le traitement des mycoses cutanées. Elle constitue un traitement indiscutablement efficace des infections cutanées.

Glossaire

GLOSSAIRE

Actidione : nom commercial du cycloheximide, antibiotique antifongique, qui, inclus dans les milieux de cultures, inhibe la croissance de nombreuses moisissures.

Agar : polymère de l'agarose qui rentre dans la composition des milieux de culture solide en microbiologie. Aussi appelé gélose.

Absolute : Produit ayant une odeur caractéristique, obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un rétinol par extraction à l'éthanol à température ambiante. La solution éthanolique obtenue est généralement refroidie et filtrée par distillation.

Allelopathie : c'est un phénomène où de nombreuses espèces végétales synthétisent des molécules capables d'agir sur le développement des plantes avoisinantes

Anthropophile : se dit d'un champignon qui se développe préférentiellement ou exclusivement chez l'homme. Exemple : les dermatophytes anthropophiles sont des parasites humains exclusifs.

Antifongique : se dit d'un médicament qui agit contre les infections provoquées par les champignons ou les levures parasites. SYN : antimycosique.

Antiseptique : se dit d'un agent, d'un médicament propre à prévenir les infections.

Anti-inflammatoire : qui fait dégonfler et diminuer l'irritation. La plupart des anti-inflammatoires sont aussi des antidouleurs

Antispasmodique : se dit d'un médicament qui calme les spasmes.

Arôme : S'emploie pour caractériser :

- l'odeur des corps volatils issus des aliments ou boissons et perçue au cours de leur dégustation ;
- la propriété odorante des aliments et boissons responsable de la saveur.

Astringent : Se dit d'une substance qui resserre les tissus ou diminue la sécrétion.

Carminatif : qui résorbe les gaz intestinaux

Cellules sécrétrices : les cellules sécrétrices se rencontrent dans l'épiderme et dans les tissus plus profonds des végétaux. Ce sont certaines cellules épidermiques de tiges, de feuilles, de pétales et d'écailles. Elles diffèrent des autres cellules épidermiques par leur taille plus petite et par l'absence fréquente de cutine dans leurs parois.

Cicatrisant : Se dit d'une substance qui favorise la cicatrisation.

Colite : inflammation du côlon.

Compost : mélange de terre, de chaux, etc., et qui sert d'engrais.

Concrète : Extrait à odeur caractéristique, obtenu à partir d'une matière première fraîche d'origine végétale, par extraction au moyen d'un solvant non aqueux, suivie de l'élimination de ce solvant par un procédé physique.

Carpelles : définissent les organes reproducteurs femelles formant le pistil ou gynécée.

Drupe : fruit en partie charnu possédant le plus souvent un seul noyau (ex : cerise).

Dermatophytie : mycose produite par un dermatophyte

Dermatophytide : éruption cutanée d'origine allergique, liée à la présence d'un dermatophyte à distance. Aussi appelée trichophytide.

Diurétique : qui favorise l'élimination de l'urine

Eczéma : syndrome caractérisant plusieurs maladies cutanées, d'origine immunoallergique mais de mécanismes variables, se manifestant, dans sa forme aiguë, par des lésions rouges, suintantes et très prurigineuses.

Emétique : qui provoque des vomissements

Epicarpe : Pellicule, peau qui recouvre un fruit.

Epidermophytie : mycose superficielle de la peau (épiderme) provoquée habituellement par un dermatophyte.

Epiphyte : qualifie des espèces de végétaux qui vivent sur les troncs, les branches, les feuilles d'un autre végétal.

Erythème : affection cutanée donnant lieu à des rougeurs disparaissant à la pression.

Escarre : nécrose cutanée dans laquelle les tissus mortifiés forment une croûte noirâtre qui se détache spontanément.

Expectorant : qui calme la toux ; favorise l'expulsion des sécrétions bronchiques

Fébrifuge : qui enrage la fièvre

Filament mycélien : structure élémentaire du thalle des champignons filamenteux, d'aspect tubulaire, septé ou non. L'ensemble des filaments mycéliens constitue le mycélium ou thalle. Synonyme : hyphes.

Filamenteux : qualificatif courant en mycologie pour désigner les champignons qui produisent des filaments par opposition aux levures au thalle unicellulaire.

Fongique : qui se rapporte aux champignons.

Flaveur : L'ensemble des sensations olfactives et gustatives perçues pendant la consommation d'un produit.

Géophile : se dit des champignons dont le biotope habituel est la terre ou le sol.

Glabre : se dit d'une culture ou d'une structure dépourvue de poils.

Hémorroïdes : varices des veines de l'anus et du rectum.

Hémostatique : propre à arrêter les hémorragies.

Immunostimulant : qui amplifie des réactions de défense de l'organisme

Kératine : scléroprotéine complexe, soufrée, de consistance dure, imperméable, très répandue dans le monde animal et parfois présente dans la paroi de certains champignons. Chez l'homme, la kératine est abondante dans l'épiderme (kératinocytes) et les phanères (cheveux, poil, ongles).

Kératinophile : se dit de certains champignons présentant une affinité pour la kératine animale ou humaine. Dans le sol la kératine est aussi présente (fragments de plumes d'oiseaux, de carapaces d'insectes,...).

Membrane : structure biologique formée de feuilles comportant une bicouche lipidique où sont insérées diverses protéines.

Moisissure : terme d'usage courant désignant des champignons filamenteux issus du sol où ils vivent habituellement en saprophytes. Certains d'entre eux peuvent cependant se comporter, chez l'homme ou l'animal, en pathogènes opportunistes.

Monoaperturé : se dit d'un pollen présentant un seul pore (ou fente de sortie).

Mycélium : ensemble des hyphes constitutifs de l'appareil végétatif des champignons.

Mycète : ce sont des organismes eucaryotes, hétérotrophes, constitués d'un thalle unicellulaire ou filamenteux et vivant en saprophytes ou parfois en parasites.

Mycose : manifestation provoquée par la présence d'un champignon microscopique dans l'organisme. On distingue les mycoses superficielles, et les mycoses profondes ou systémiques.

Nucelle : tissu de réserve, diploïde, d'origine maternelle, il est en général transitoire et disparaît lors de la croissance de l'embryon. S'il persiste dans la graine, il est alors appelé périsperme.

Ombelle : inflorescence indéfinie dont les fleurs, situées dans le même plan, sont portées par des pédoncules partant du même point. L'ombelle étant axillaire par une bractée, on observe généralement un involucre à la base de l'ombelle (et un involucre à la base de l'ombellule).

Ovaire supère : l'ovaire est insérée dans la fleur au dessus des pétales et sépales.

Œdème : accumulation anormale de liquide sereux dans les espaces intercellulaires du tissu conjonctif.

Parasite : être vivant (animal, végétal, champignon) qui vit aux dépens d'une autre espèce vivante appelée hôte.

Parasitisme : comportement propre aux parasites vis-à-vis de leurs hôtes.

Perianthe : l'ensemble des pétales (corolle) et des sépales (calice).

Péricarpe : enveloppe du fruit, provenant du développement des parois du carpelle.

Placentation : désigne la disposition des ovules à l'intérieur de l'ovaire. Une placentation basilaire indique que les ovules sont fixés à la base des carpelles.

Poches sécrétrices : ce sont des formations anatomiques végétales qui reçoivent et accumulent l'huile essentielle élaborée par les cellules sécrétrices qui les bordent. Les poches sécrétrices se rencontrent généralement chez les MYRTACEES.

Poils sécréteurs : les poils sécréteurs ont une forme très variable. L'essence exsudée du cytoplasme s'accumule dans la paroi externe de la cellule sous la cuticule qu'elle distend. Les poils sécréteurs se rencontrent le plus souvent chez la famille des LABIEES ;

Pubescent : se dit d'une feuille, d'une tige qui est couverte de poils fins et courts.

Saprophyte : se dit d'un organisme vivant qui se nourrit à partir de substrats organiques en décomposition (matière morte).

Sédatif : se dit de toute substance qui agit contre la douleur, l'anxiété, l'insomnie ou qui modère l'activité d'un organe.

Teinture : solution obtenue en laissant une certaine quantité de drogue desséchée au contact d'un solvant pour un temps plus ou moins long

Spore : élément ovoïde produit par les bactéries ou les champignons

Sessile : qualifie une fleur, un fruit ou une feuille sans pédoncule ou pétiole.

Spore : élément issu de la reproduction sexuée ou asexuée des champignons et destiné à assurer la survie du champignon et sa propagation.

Sporulation : aptitude d'un champignon à produire des spores. Synonymes : reproduction, fructification.

Stipules: petites pièces foliacées, à la base du pétiole, au niveau de son insertion sur la tige.

Style : partie rétrécie placée entre l'ovaire et le stigmate.

Taxon : unité systématique de rang quelconque. Les taxons courants sont le genre, le sous-genre, l'espèce, la sous-espèce, la variété.

Thalle : ensemble de l'appareil végétatif et reproducteur d'un champignon. Il peut être unicellulaire (levure) ou filamenteux.

Tubercule : organe généralement souterrain de nature caulinaire, renflé, au niveau duquel sont stockées des réserves.

Ulcération : formation d'ulcère, l'ulcère lui-même.

Vermifuge : Se dit d'un remède propre à faire évacuer les vers intestinaux.

Verticille : ensemble d'organes (rameaux, feuilles, pièces florales) disposés en cercle autour d'un axe, au même niveau.

Zona : maladie infectieuse, d'origine virale, caractérisée par des éruptions cutanées localisées sur le trajet des nerfs de sensibilité.

Zygomorphe : se dit d'une fleur «irrégulière», *i.e.* à symétrie non axiale. La symétrie est souvent bilatérale ; elle est parfois inexistante.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Hulin A, Deguillaume A.M, Bretagne S, Bézie Y - Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives - J Pharm Clin; Vol.24 N°3; pp 125-38. 2005
- [2] Ouraïni D, Agoumi A, Alaoui M.I, Alaoui K, Cherrah Y , Alaoui M.A , Belabbas M.A - Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques – Phytothérapie; Vol.1; pp 6–14. 2007
- [3] Benkiki N -Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes: *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*- Thèse de doctorat; Université El-Hadj-Lakhdar. Batna. 2006
- [4] Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi M.S et Ghorbani A- Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology- Iranian Journal of Pharmaceutical Research; Vol. 2; pp 63-79. 2005
- [5] Babulka P- Plantes médicinales du traitement des pathologies rhumatismales: de la médecine traditionnelle à la phytothérapie moderne ; Phytothérapie, Vol.5, pp 137–145. 2007
- [6] Bouaoun D, Hilan C, Garabeth F, Sfeir R- Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss – Phytothérapie; Vol.5; pp 129–134. 2007
- [7] Dorman H.J.D, et Deans S.G- Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils- Journal of Applied Microbiology; Vol. 88; N° 2, pp 308-316. 2000
- [8] Prabuseenivasan S, Jajakumar M, Ignacimuthu S- In vitro antibacterial activity of some plant essential oils; BioMed Central Complementart and Altemative Medicine, Vol. 6, N° 39. 2006
- [9] Schelz Z, Molnar J, Hohmann J- Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils- Fitoterapia; Vol.77; pp 279-285. 2006
- [10] Rios J.L, Recio M.C- Medicinal plants and antimicrobial activity- Journal of Ethnopharmacology;Vol. 100; pp 80-84. 2005
- [11] Sartoratto A, Machado A.L.M, Delarmelina C, Figueira G.M, Duarte M.C.T, Rehder V.L.G- Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in BRAZIL- Brazilian Journal of Microbiology; Vol. 35; pp 275-280. 2004
- [12] Gachkar L, Yadegari D, Rezaei M.B, Taghizadeh M, Astaneh S.A, Rasooli I- Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils- Food Chemistry; Vol. 102; pp: 898-904. 2007

- [13] Dimitrijevic S.I, Mihajlovski K.R, Antonovic D.G, Milanovic-Stevanovic M.R, Mijin D.Z- A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L- Food Chemistry; Vol. 104; pp 774–782. 2007
- [14] Mata A.T, Proença C, Ferreira A.R, Serralheiro M.L.M, Nogueira J.M.F, Araújo M.E.M- Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices- Food Chemistry; Vol. 103; pp 778–786. 2007
- [15] Oussala M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M- Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat- Meat Science; Vol. 73; pp 236-244. 2006
- [16] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Review MI-Biological effects of essential oils- A review Food and Chemical Toxicology; Vol. 46; pp 446–475. 2008
- [17] Association Française de Normalisation, Recueil de normes Françaises “Huiles essentielles”, AFNOR, Paris. AFNOR NF T 75-006. 2000
- [18] Lahlou M-Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils- Phytotherapy research; Vol.18; pp 435-448. 2004
- [19] Bruneton J, "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, monoterpènes et sesquiterpènes ; TEC & DOC, 3eme édition, pp 484-497. Lavoisier. Paris. 1999
- [20] Anton R, Lobstein A- Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles ; Tec & Doc, Paris, 522 p. 2005
- [21] Thompson J.D, Chalchat J.C, Michet A, Linhart Y.B, Ehlers B- Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes- Journal of Chemical Ecology; Vol. 29; N°4. 2003
- [22] Ormeno E, Fernandez C, Mévy J.P- Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species- Phytochemistry; Vol. 68; pp 840–852. 2007
- [23] Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Abdelouahid D.E- Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie- Phytothérapie; Vol. 6; pp 153–159. 2008
- [24] Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L, Vergnes MF- Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne – Phytothérapie; Vol. 6; pp 160–164. 2008
- [25] Rota M.C, Herrera A, Martinez R.M, Sotomayor J.A, Jordán M.J- Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils- Food Control; Vol. 19; pp 681–687. 2008

- [26] Vila R, Mundina M, Tomi F, FurSan R, Zacchino S, Casanova J, Canigüeral S- Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*- *Planta med*; Vol. 68; pp 164-167. 2008
- [27] Vandermoten S, Cusson M, Francis F, Haubruge E- La biosynthèse des isoprénoides chez les pucerons: une cible potentielle de nouveaux bio-insecticides- *Biotechnol; Agron. Soc. Environ*; Vol. 12; N°4; pp 451-460. 2008
- [28] Gherman C, Culea M, Cozar O- Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS- *Talanta*; Vol. 53; pp 253-262. 2000
- [29] Lee S.J, Umamo K, Shibamoto T, Lee K.G- Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties- *Food Chemistry*; Vol. 91; pp 131–137. 2005
- [30] Schwämmle B, Winkelhausen E, Kuzmanova S, Steiner W- Isolation of carvacrol assimilating microorganisms- *Food Technol. Biotechnol*; Vol. 39;N°4; pp 1-345. 2001
- [31] Tepe B, Sokmen M, Akpulat H.A, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A- Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp.sipyleus var. sipyleus and *Thymus sipyleus* subsp. sipyleus var. rosulans- *Journal of Food Engineering*; Vol. 66; pp 447–454.2005
- [32] Michiels J, Missotten J, Fremaut D, De Smet S, Dierick N- In vitro dose–response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora- *Livestock Science*; Vol. 109; pp 157–160. 2007
- [33] Botelho M.A, Nogueira N.A.P, Bastos G.M, Fonseca S.G.C, Lemos T.L.G, Matos F.J.A, Montenegro D, Heukelbach J, Rao V.S, Brito G.A.C-Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens *Lippia sidoides* essential oil against oral pathogens- *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; Vol. 40; pp 349-356. 2007
- [34] Loziene K, Venskutonis P.R, Sipailiene A, Labokas J- Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes- *Food Chemistry*; Vol. 103; pp 546–559. 2007
- [35] Bagamboula C.F, Uyttendaele M, Debevere J- Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*- *Food Microbiology*; Vol. 21; pp 33–42. 2004
- [36] Fellah S, Romadhane M, Abderraba M- 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. 2006
- [37] Sokmen A, Gulluce M, Akpulat H.A, Daferera D, Tepe B, Polissiou M,Sokmen M., Sahin F- The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*; *Food Control*, Vol. 15; pp 627-634. 2004

- [38] Loziene K, Venskutonis P.R- Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*- Biochemical Systematics and Ecology; Vol. 33; pp 517–525. 2005
- [39] Franchomme P, Pénoël D - Matière médicale aromatique fondamentale- L'aromathérapie exactement ; Roger Jallois éditeur ; Limoges, Vol. 4 ; pp 317-446. 1990
- [40] Dunford N.T, Vazquez R.S - Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions- Journal of Applied Horticulture; Vol. 7; N°1; pp 20-22. 2005
- [41] Naghdi B.H, Yazdani D, Mohammad Ali S, Nazari F- Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L- Industrial Crops and Products; Vol. 19; pp 231–236. 2004
- [42] Lamarti A, Badoc A, Deffieux G, Carde J.P- Biogénétique des monoterpènes- Bull. Soc. Pharm. Bordeaux; Vol. 133; pp 79-99. 1994
- [43] Lamarti A. Badoc A, Deffieux G, Carde J.P- Biogénétique des monoterpènes. III - Monoterpènes synthétases - Bull. Soc. Pharm. Bordeaux; Vol. 133; pp 100-118. 1994
- [44] Dubey V.S, Bhalla R et Luthra R- An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid bio synthesis in plants- J. Biosci; Vol. 28; N°5; pp 637-646. 2003
- [45] Lucchesi M.E, Smadja J, Bradshaw S, Louw W, Chemat F- Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil- J. Food Engineer; Vol. 79; pp 1079-1086. 2007
- [46] Wang J, Sun B, Cao Y, Tian Y, Li X- Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran- Food Chemistry; Vol. 106; pp 804–810. 2008
- [47] Silou T, Malanda M, Loubaki L - 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. 2004
- [48] Senhaji O, Faid M, Kalalou I- Etude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de cannelle –Phytothérapie; Vol. 1; pp 24–30. 2006
- [49] Marzouk Z, Neffati A, Marzouk B, Chraief I, Khemiss F, Chekir Ghedira L, Boukef 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. 2006
- [50] Djabou N -*Sambucus Nigra* L., une plante de la pharmacopée traditionnelle Nord africaine - Thèse de Magistère en chimie, université Abou-Bekr Belkaid; Tlemcen. 2006
- [51] Cavalli J.F -Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar- Thèse de doctorat en Chimie Organique et Analytique; université de Corse Pascal Paoli. 2002

- [52] Bouchra C, Achouri M, Hassani L.M.I, Hmamouchi M- Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr -Journal of Ethnopharmacology;Vol. 89; pp 165-169. 2003
- [53] Rasooli I, Abyaneh M.R - Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*-Food Control; Vol. 15; pp 479–483. 2004
- [54] Bouchonnet S, Libong D - La couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse- Mémoire d'Ingénieur; Département de chimie; Ecole Polytechnique 91128 Palaiseau Cedex. 2001
- [55] Bouhdid S, Idaomar M, Zhiri A, Baudoux D, Skali N.S And Abrini J- Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities- Congrès International de Biochimie. Agadir; Vol; 09; pp12. 2006
- [56] Hilan C, Sfeir R, Jawish D et Aitour S - Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae - Lebanese Science Journal; Vol. 7; N° 2. 2006
- [57] Miller R.E, McConville M.J, Woodrow I.E - Cyanogenic glycosides from the rare Australian endemic rainforest tree *Clerodendrum grayi* (Lamiaceae)- Phytochemistry; Vol. 67; pp 43–51. 2006
- [58] Choudhury R.P, Kumar A, Garg A.N - Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behaviour- Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; Vol. 41; pp 825–832. 2006
- [59] Elhabazi K, Dicko A, Desor F, Dalal A, Younos C, Soulimani R-Preliminary study on immunological and behavioural effects of *Thymus broussonetii* Boiss., an endemic species in Morocco- Journal of Ethnopharmacology;Vol 103, pp 413–419. 2006
- [60] Ebrahimi S.N, Mirjalili J.H, Sonboli A, Yousefzadi M- Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages- Journal Food Chemis; Vol. 10; pp 1016. 2008
- [61] <http://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments>.
- [62] Rasooli I, Rezaei M.B, Allameh A- Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*- International Journal of Infectious Diseases; Vol. 10; pp 236-241. 2006
- [63] Cosentino S, Tuberoso C.I.G, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E and Palmas F- *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils- Letters in Applied Microbiology; Vol. 29; pp 130–135. 1999
- [64] Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan K, Abu-Shanab F - Antibacterial Effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*-Turk J Biol; Vol. 30; pp 239-242. 2006

- [65] Soto-Mendivil E.A, Moreno-Rodriguez J.F, Estarron-Espinosa M, Garcia-Fajardo JA et Obledo-Vazquez E.N - Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*- E-Gnosis [online]; Vol. 4; N° 16. 2006
- [66] Dob T, Dahmane D, Chelghoum C- Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss et Reuter- The International Journal of Aromatherapy; Vol. 16; pp 95-100. 2006
- [67] Nickavar B, Mojab F, Dolat-Abadi R- Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran- Food Chemistry; Vol. 90; pp 609–611. 2005
- [68] Saidj F- Extraction de l'huile essentielle de thym: *Thymus numidicus kabylica*- Thèse de magistère en Technologie des hydrocarbures, Département génie des procédés chimiques et pharmaceutiques; université M'Hamed Bougara – Boumerdes. 2006
- [69] Özcan M, Chalchat J.C- Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey- Bulg. J. Plant Physiol; Vol. 30; N°3-4; pp 68-73. 2004
- [70] Bounatirou S, Smiti S, Miguel M.G, Faleiro L, Rejeb M.N, Neffati M, Costa M.M, Figueiredo A.C, Barroso J.G, Pedro L.G - Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link- Food Chemistry; article in press. 2007
- [71] Rasooli I, Mirmostafa S.A- Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils- Fitoterapia; Vol.73; pp 244-250.2002
- [72] Pauli A, Knobloch K- Inhibitory effects of essential oil components on growth of food-contaminating fungi- Z Lebensm Unters Forsch; Vol. 185; pp 10-13. 1987
- [73] Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu B.A, Kurkuoglu M, Can Baser K.H- Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test- Food Chemistry; Vol. 93; pp 551–556. 2005
- [74] Szentandrassy N, Szentesi P, Magyar J, Nánási P.P and Csernoch L - Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle- BMC Pharmacology; Vol. 3; pp 9.2003
- [75] Koba K, Sanda K, Raynaud C, Millet J, Chaumont J.P- Composition chimique des huiles essentielles d'*Aeollanthus pubescens* Benth. acclimatée au Togo- C. R. Chimie; Vol 7; pp 1107–1111. 2004
- [76] Prabuseenivasan S, Jayakumar M et Ignacimuthu S- In vitro antibacterial activity of some plant essential oil; BioMed Central Complementary and Alternative Medicine; Vol. 6; pp 39. 2006

[77] Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Naghdibadi H- Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus Xavus* in liquid medium and tomato paste- Food Control; Article in press. 2007

[78] Valero M, Francés E - Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth- Food Microbiology; Vol. 23; pp 68–73. 2006

[79] de Billerbeck V-G- Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques – Phytothérapie; Vol. 5; pp 249–253. 2007

[80] Domaracky M, Rehak P, Juhas Š, Koppel J - Effects of Selected Plant Essential Oils on the Growth and Development of Mouse Preimplantation Embryos In Vivo- Physiol. Res; Vol. 56; pp 97-104. 2007

[81] Edris A.E, Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review- Phytother. Res; Vol. 21; pp 308-323. 2007

[82] Jukič M. et Miloš M- Catalytic oxidation and antioxidant properties of thyme essential oils (*Thymus vulgaris* L.)- Croatica Chemica Acta ; Vol. 78; N°1; pp 105-110. 2005

[83] Inouye S, Abe S - Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse- Phytothérapie; Vol. 1; pp 2–4. 2007

[84] Doughari J.H, Obidah J.S - In vitro antifungal activity of stem bark extracts of *Leptadenia lancifolia*- International Journal of Integrative Biology, Vol. 3; N°2; pp 111. 2008

[85] Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R - Comparative evaluation of 11 essential oils of different origins functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods- Food Chemistry; Vol. 91; pp 621–632. 2005

[86] Feng W et Zheng X - Essential oils to control *Alternaria alternaria* in vitro and in vivo- Food Control; Vol. 18; pp 1126-1130. 2007

[87] Glordani R, Kaloustian J - Action anticandidosique des huiles essentielles: leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques- Phytothérapie; Vol. 3; pp 121–124. 2006

[88] Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves M.J, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A and Martinez-de-Oliveira J - Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species- Journal of Medical Microbiology; Vol. 55; pp 1367–1373. 2006

[89] Maksimović Z, Milenković M, Vučićević D, Ristić M- Chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus pannonicus* All. (*Lamiaceae*) essential oil- Cent Eur; J. Biol; Vol. 3; N°2; pp 149–154. 2008

- [90] Klaric M.S, Kosalec I, Mastelic J, Pieckova E, Pepeljnak S - Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings- Letters in Applied Microbiology; Vol. 44; N°1; pp 36-42. 2006
- [91] Winward G.P, Avery L.M, Stephenson T, Jefferson B - Essential oils for the disinfection of grey water-Tech Rep Ser; Vol. 905; pp 1-109. 2002
- [92] Horváth G.y, Kocsis B, Botz L, Németh J, Szabó L.G.y - Antibacterial activity of Thymus phenols by direct bioautography- *Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology, S3-P03* Acta Biologica Szegediensis; Vol. 46; N°3-4; pp 145-146. 2002
- [93] Zambonelli A, D'Aurelio A.Z, Severi A, Benvenuti E., Maggi L, Bianchi A - Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of thymus vulgaris L- J. Essent. Oil Res; Vol 16; N°1; pp 69-74. 2004
- [94] Hilan C et Sfeir R - Antimicrobial effect of essential oil of *Salvia libanotica* (sauge)- The British Journal of phytotherapy; Vol. 4; pp 155-162. 1998
- [95] Haddaf Y, Kaloustian J, Giordan RRegli P, Chefrour A, Abou L, Mikail C, Portugal H -Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. et de *Thymus numidicus* Poiret d'Algerie- 6^e symposium international d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales ; Grasse, France. 2004
- [96] Carson C.F, Mee B.J, and Riley T.V- Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy- Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Vol. 46; pp 1914–1920. 2002
- [97] Cox S.D, Mann C.M, et al. - The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)- Journal of Applied Microbiology; Vol. 88; N°1; pp 170-175. 2000
- [98].Carnesecchi S, Bras-Gonçalves R, Bradaia A, Zeisel M, Gossé F, Poupon M F, Raul F - Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorourcil efficacy on human colon tumor xenografts- Cancer Lett; Vol. 215; pp 53-59. 2004
- [99] Suhr K I and Nielsen P.V - Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi- Journal of Applied Microbiology; Vol. 94; pp 665–674. 2003
- [100] Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O and Savoia D - In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*- Letters in Applied Microbiology; Vol. 31; pp 174-177. 2000

- [101] Laplante A - Mécanismes de réépithélialisation de plaies cutanées: expression des protéines de stress chez la souris et analyse à l'aide d'un nouveau modèle tridimensionnel humain développé par génie tissulaire- Thèse de doctorat ; université Laval. 2002
- [102] Degim T-Understanding skin penetration: computer aided modeling and data interpretation; Current Computer-Aided Drug Design; Vol. 1; pp 11-19.2005.
- [103] Tran H.V, Charleux F, Ehrlacher A, Ho Ba Tho M.C - Propriétés mécaniques multicouches de la peau humaine *in vivo* Modèle numérique anatomique- Colloque National en Calcul des Structures. 2005
- [104] Comprendre la peau Les grandes fonctions de la peau -Ann Dermatol Venereol; Vol. 132; pp 8S49-68. 2005
- [105] Weisse S - Complexes cyclodextrines / ester de vitamine A : stabilisation, solubilisation et promotion de l'absorption cutanée- Thèse de doctorat ; université PARIS ; XI série N° 741. 2002
- [106] Cuminet J- Les carcinomes annexiels cutanes a propos de 17 cas; Thèse de doctorat d'etat en medecine ; Faculté de medecine Cochin Port-Royal ; université Rene Descartes. 1999
- [107] Descargues P, Deraison C, Bonnart C et Hovnanian A- Syndrome de Netherton : un modèle d'étude de la régulation de la desquamation- Médecine Sciences ; Vol. 21; N°5; pp 457-458. 2005
- [108] Thiers S, Tasseaul O - Les cosméceutique: cosmétiques ou médicaments?- MIDIFAB ; Vol. 3 ; pp 45-56. 2005
- [109] Seiller M, Martini M.C - Formes pharmaceutiques pour application locale- TEC&DOC ; 11, rue Lavoisier F75384 ; Paris cedex 08 ; ISBN: 2-7430-0038-4, pp 13. 1996
- [110] Aiache J.M, Aiache S, Renoux R - Initiation à la connaissance du médicament-Préface du Pr Y. Cohen. 4^e édition 220-225. © Masson, Paris, Masson S.A – 120, bd Saint-Germain. 75280 Paris Cedex 06. 1989-2001
- [111] Le Hir A - Abrégé de paharmacie galénique 3^e édition p: 346 Préface du Pr Y. Cohen. © Masson, Paris, Masson S.A – 120, bd Saint-Germain. 75280 Paris Cedex 06. 1981
- [112] Rhayour K - Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur Esherichia coli, Bacillus subtilis et sur Mycobacterium phlei et Mycobacterium fortuitum; Thèse de Doctorat National. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté des Sciences Dhar Mehraz -Fès-. 2002
- [113] Hart T, Shears P - Atlas de poche de microbiologie Médecine-Sciences- Flammarion 4, rue, Casinir-Delarigne, 75006 PARIS ISBN : 2-257-10125-1. 1997

- [114] Nikoh N, Iwabe N, Kuma K.I, Miyata T - Phylogenetic relationship of the kingdoms of Animalia, Plantae, and Fungi, inferred from 23 different protein species- Mol Biol Evol; Vol. 11; pp 762-768. 1994
- [115] Hamoir J, Goret M, Mignon B, Gustin P - Actualité sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre du traitement des dermatophytoses chez les carnivores domestiques- Ann. Méd. Vét ; Vol. 145 ; pp 226-232. 2001
- [116] Examen mycologique en dermatologie- Ann Dermatol Venereol; Vol.132; pp 8S89-104. 2005
- [117] Alcamo E - Fundamentals of microbiology (5ème édition): *The fungi*- Adison Wilsey Longman Inc; pp 429-461. 1997
- [118] Wang† L, Ma L, Leng W, Liu T, Yu L, Yang J, Yang L, Zhang W, Zhang Q, Dong J, Xue Y, Zhu Y, Xu X, Wan Z, Ding G, Yu F, Tu K, Li Y, Li R, Shen Y, Jin Q - Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed equence tags- BioMed Central Genomics; Vol. 7; pp 255. 2006
- [119] Feuilhade M, Bazex J, Claudy A, Roujeau J.C - Infections cutanéés muqueuses bactériennes et mycosiques. Infections à dermatophytes de la peau glabre, des plis et des phanères- Ann Dermatol Venereol ; Vol. 129 ; pp 2S58-2S64. 2002
- [120] Brouta F, Descamps F, Losson B, Mignon B - Données récentes sur la pathogénèse de l'infection à *Microsporum canis* chez les carnivores domestiques- Ann. Méd. Vét ;Vol. 145 ; pp 236-242. 2001
- [121] Arrese J.E , Piérard-Franchimont C, Piérard G.E - Les teignes du cuir chevelu d'ici et d'ailleurs : quand la prévention est à géographie variable- Rev Med Liège ; Vol. 58; pp 388-391. 2003
- [122] Prasad R, Kapoor K - Multidrug resistance in yeast *Candida*- Int. Rev. Cytol; Vol. 242; pp 215-248. 2004
- [123] Sheehan D. J, Hitchcock C.A and Sibley C.M - Current emerging azole antifungal agents- Clin. Microbiol. Rev ; Vol. 12; N°1 ; pp 40-79. 1999
- [124] Bssaibis F, Gmira N, Meziane M - Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter- Rev. Microbiol. Ind. San et Environn ; Vol. 3; N°1; pp 44-55. 2009
- [125] Pharmacopée Européenne 6eme édition. 2002
- [126] Evaluation de la tolérance cutanée in vivo, MO.C.LP.007, Version B, 10/12/2003, S Vidal - CRD. Documents de référence: Y. Cohen et D. Pradeau. L'analyse pratique des médicaments, éditions médicales internationales, 1992
- [127] Zaika L. L - Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its Determination- Journal of Food Safety; Vol. 9; N° 2; pp 97-118. 1988

- [128] Kabouche Z, Boutaghane N, Laggoune S, Kabouche A, Ait-Kaki Z et Benlabed K - Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria- The International Journal of Aromtherapy; Vol. 15; pp 129-133. 2005
- [129] Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et extraits naturels de plantes- SAIDAL-CRD ; Documents de référence: Pharmacopée européenne 2002.
- [130] Ouraïni D, Agoumi A, Alaoui M.I, Alaoui K, Cherrah Y, Benlemlih M, Alaoui M, Belabbas M.A - Approche thérapeutique des dermatophyties par les huiles essentielles de plantes aromatiques marocaines- Phytothérapie; Vol. 1; pp 3-12. 2005
- [131] Ouraïni D, Agoumi A, Alaoui M.I, Alaoui K, Cherrah Y, Amrani M, Belabbas M A - Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes- Phytothérapie; Vol. 4 ; pp 147-157. 2005
- [132] Mohammedi Z - Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïde de quelques plantes de la région de Tlemcen- Thèse de magistère de l'université Abou Bakr Belkaïd – Tlemcen. 2006
- [133] Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, Chelghoum C - Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii*- Journal of Pharmaceutical biology (Pharm. biol.);Vol. 44; N°8; pp 607-612. 2006
- [134] Ghannadi A, Sajjadi S.E, Kabouche A, Kabouche Z - *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut.: A potential source of Thymol-Rich essential oil in North Africa- journal of biosciences (Z. Naturforsch., C J. biosci.); Vol. 59; N°3-4; pp 187-189. 2004
- [135] Allain P, El Oualidi J, Puech S et Pellecuer J - La variabilité chimique de l'huile essentielle chez *Teucrium puechiae* Greuter et Burdet sur le littoral Languedocien (France)- Biochemical Systematics and Ecology ; Vol. 22 ; N°3 ; pp 239-248. 1994
- [136] Hudaib M, Speroni E, Di Pietra A.M, Cavrini V - GC/MS evaluation of thymus (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle- J. Pharma. Biom. Analysis; Vol. 29; N°4; pp. 691-700. 2002
- [137] Özgüven M, Tansi S - Drug Yield and Essential Oil of *Thymus vulgaris* L. as in Influenced by Ecological and Ontogenetical Variation- Tr. J. of Agriculture and Forestry; Vol. 22; pp 537-542. 1998
- [138] Jordan M. J, Mart'inez R. M, Goodner K.L, Baldwin E. A, Sotomayor J.A - Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition- Industrial Crops and Products; Vol. 24; pp 253–263. 2006
- [139] Chowdhury A.R, Gupta R.C, Sharna M.L.- Essential oil from the rhizomes of *acorus calamus* L. raised on alkaline soil- Ind. Perfumer; Vol. 41; pp 154-156. 1997

- [140] Juiliani R.H, Koroch A, Simon J.E, Hitimana N, Daka A, Ranarivelo L, Langenhoven P - Quality of geranium (*Pelargonium* sp.): Case studies in Southern and Eastern Africa- *Journal of essential oil research*; Vol. 18; pp 116-121. 2006
- [141] Hadhili L, Romdhane M, Abderrabba M - Extraction de l'huile essentielle de thym (*Thymus capitatus*): Etude quantitative et qualitative de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation et entraînement à la vapeur. International symposium on perfume, aromatic and medicinal plants: from production to valorization- SIPAM; 2-4 November; Jerba – Tunisia. 2006
- [142] Mutai C, Bii C, Vagias C, Abatis D, Roussis V - Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes- *Journal of Ethnopharmacology*; doi:10.1016/j.jep.02.007. 2009
- [143] Djeddi S, Bouchenah N, Settar I, and Skaltsa H.D - Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from ALGERIA- *Chemistry of Natural Compounds*; Vol. 43; N° 4. 2007
- [144] Oussou K.R, Yolou S, Boti J.B, Guessenn K.N, Kanko C, Ahibo C Casanova J - Etude Chimique et Activite Antidiarrheique des Huiles Essentielles de Deux Plantes Aromatiques de la Pharmacopee Ivoirienne- *European Journal of Scientific Research* ; Vol. 24 ; N°1 ; pp .94-103. 2008
- [145] El Ajjouri M, Satrani B, Ghanmi M, Aafi A, Farah A, Rahouti M, Amarti F, Aberchane M - Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre- *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*; Vol.12; N°4; pp 345-351. 2008
- [146] Hammoum S, Kerbouche L – Activité antimicrobienne et composition chimique des huiles essentielles Germandrée et de Thym - Mémoire d'Ingenierat d'état en Agronomie ; departement technologie alimentaire et nutrition humaine ; Institut National Agronomique El-Harrach- Alger. 2007
- [147] Bousbia N - Extraction et identification de quelques huiles essentielles (Nigelle, Coriandre, Origan, Thym, Romarin): Etude de leurs activités antimicrobiennes- Thèse magistère; INA-Alger ; pp 130. 2004
- [148] Faleiro M.L, Miguel M.G, et al. - Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*- *Lett Appl Microbiol*; Vol. 36; N°1; pp 35-40. 2003
- [149] Karaman S, Digrak M, Ravid U, Ilcim A - Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey- *Journal of Ethnopharmacology*; Vol. 76; pp 183-186. 2001
- [150] Hammer K.A, Carson C.F and Riley T.V-Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts- *Journal of Applied Microbiology*; Vol. 86; pp 985–990. 1999

- [151] Al-Bayati F.A - Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts- Journal of Ethnopharmacology; Vol. 116; pp 403–406. 2008
- [152] Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M-Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat- Meat Science; Vol. 73; pp 236–244. 2006
- [153] Patinaik S, Subramanyam V.R, Kole C - Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro- Microbios; Vol. 86; pp 237-246. 1996
- [154] Amaral J.A, Ekins A, Richards S.R, and Knowles R - Effect of Selected Monoterpenes on Methane Oxidation, Denitrification, and Aerobic Metabolism by Bacteria in Pure Culture- Applied and Environmental Microbiology; Vol. 64; pp 520-525. 1998
- [155] Inouye S, Yamaguchi H and Takizawa T - Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method- J. infect. Chemother; Vol. 7; N°4; 251-254. 2001
- [156] Chao S.C, Young D.G and Oberg C.J - Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses- Journal of Essential Oil Research; Vol.12; pp 639-649. 2000
- [157] Kalemba D, and Kunicka A - Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils- Current Medicinal Chemistry; Vol.10; pp 813-829. 2003
- [158] Ultee A, Bennik M.H. J, and Moezelaar R - The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*- Applied and Environmental Microbiology; Vol. 68; pp 1561-1568. 2002
- [159] Santoro G.F, .das-G.Cardoso M, Guimarães L.G.L, Salgado A.P.S.P, Menna-Barreto R.F.S.M, Soares J- Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure- Parasitol Res; Vol. 100; pp 783–790. 2007
- [160] Inouye S, Uchida K, Maruyama N, Yamaguchi H, Abe S - A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay- Jpn. J. Med. Mycol; Vol. 47; pp 91-98. 2006
- [161] Inouye S, Uchida K, Abe S - Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*- J Infect Chemother; Vol. 12; pp 210-216. 2006
- [162] Akrouf A, Neffati M, Chemli R, Aouni M, Jerraya R, Dammak M et Dar A - Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L.Revue des Régions Arides - Numéro spécial - Actes du séminaire international « les Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales »; SIPAM 2006
- [163] Lambert J.W, Skandamis P.N, Coote P.J and Nychas G.J.E - A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol R- Journal of Applied Microbiology; Vol. 91; pp 453-462. 2001
-

[164] Valero M et Salmeron M.C – Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth- International Journal of food Microbiology; Vol. 85; pp 73-81

[165] Senhaji O, Faid M, Elyachioui M, Dehhaoui M - Étude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle Antifungal activity of different cinnamon extracts 2005- Journal de Mycologie Médicale; Vol.15; pp 220–229. 2005

[165] Belyagoubi Larbi M- Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales- Thèse de magèstèr. Département de biologie, faculté de science, université de Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.2006

ANNEXES

ANNEXE 1

ANNAXE 1: STRUCTURE ET MORPHOLOGIE BACTERIENNES

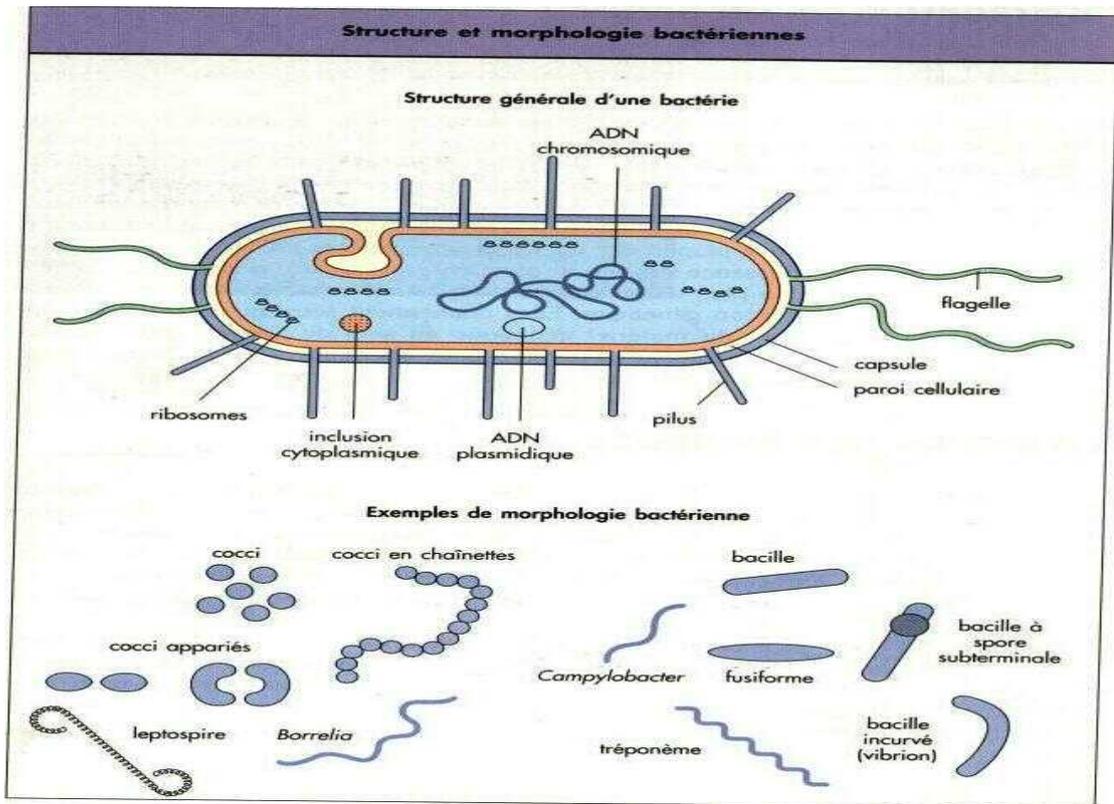


Figure I: Structure et morphologie bactérienne

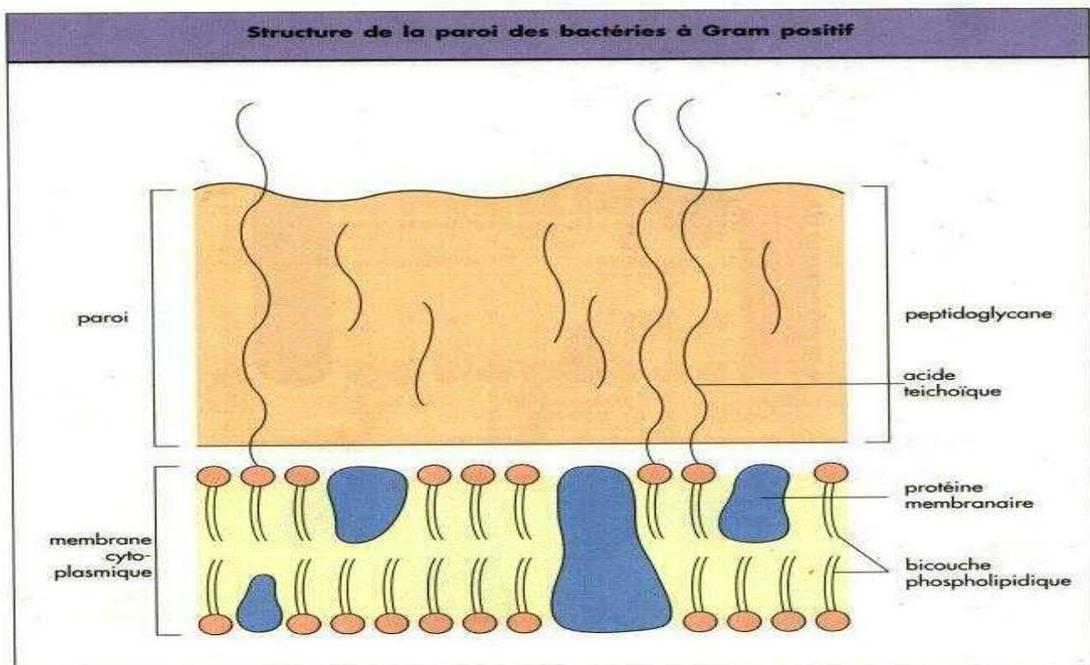


Figure II : Structure de la paroi des bactéries à Gram positif.

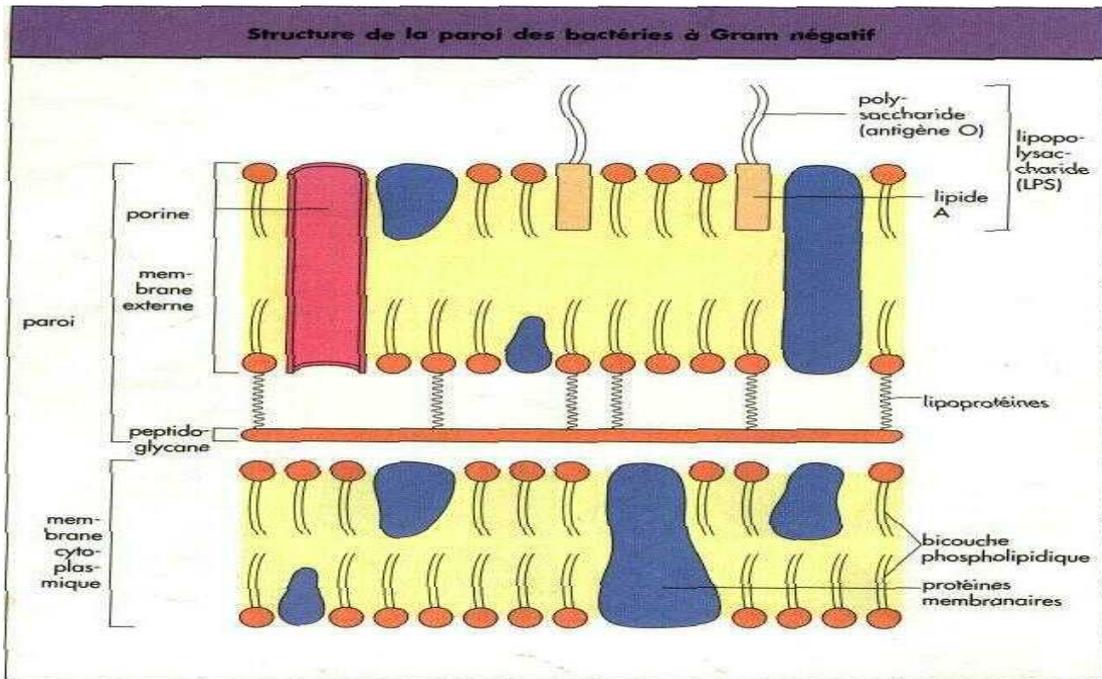
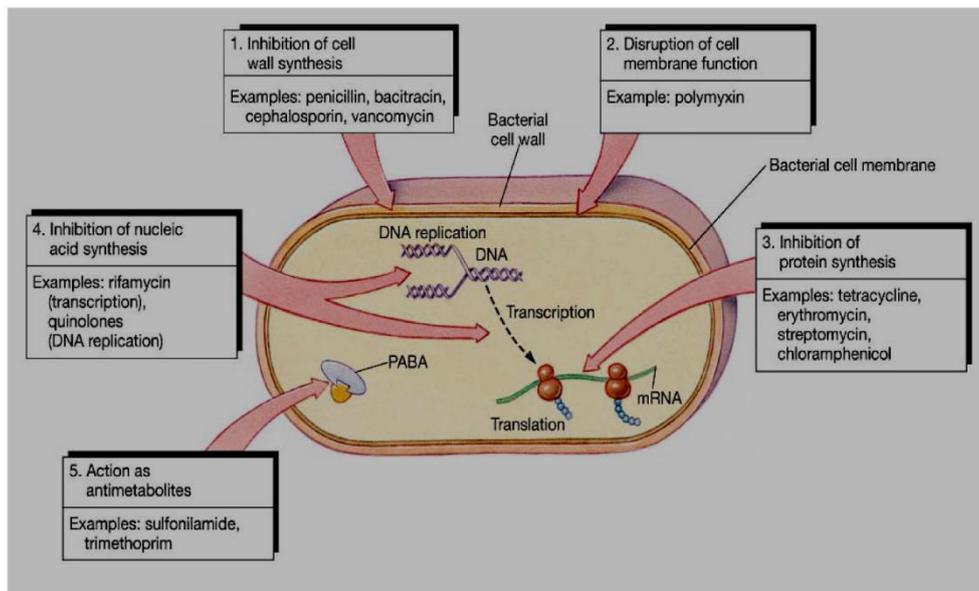


Figure III : Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif.

Cibles des antibiotiques



Cours : Lahcen Mahraoui

Figure IV : Cibles des antibiotiques

ANNEXE 2

***MENTHA CRISPA* L (MENTHE DES JARDINS)**



***Mentha crispa* L**

Les parties aériennes de *Mentha crispa* ont été récoltées durant le mois de mai (2007) pendant la période de floraison de la plante dans la région de Boumerdes (nord de l'Algérie). L'extraction a été effectuée par hydrodistillation. La composition chimique de l'huile essentielle a été déterminée par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à une Spectrométrie de Masse (CG/MS). (**Voir chromatogramme 9: ANNEXE 3**)

Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Caractéristiques physiques de l'huile essentielle

Toutes les méthodes d'analyse et les formules présentées dans ce paragraphe proviennent du recueil de normes AFNOR [17].

Densité à 20°C

Définition

La densité d'une HE est le rapport de la masse d'un volume d'HE à 20°C à celle du même volume d'eau distillée à 20°C.

Calcul

Densité relative à température ambiante :

$$d_{TA} = \frac{m_{HE} - m_{PV}}{m_E - m_{PV}}$$

m_{PV} : masse de pycnomètre vide

Densité relative à 20°C :

$$d_{20} = d_{TA} / 0,9982 (0,0007 \{t_A - 20\})$$

Où :

0,9982 g/ml est la masse volumique de l'eau à 20°C

0,0007 est un facteur correctif

t_A : température ambiante

d_{TA} : densité à température ambiante

Pouvoir rotatoire à 20°C

Définition

Angle, exprimé en milliradians et / ou degré d'angle, qui tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde (589,3 nm + 0,3 nm), correspondant aux raies D du sodium, lorsque celle-ci traverse une épaisseur de 100 mm de l'HE dans des conditions déterminées de température.

Calcul

Le pouvoir rotatoire, exprimé en degrés d'angle, est donné par l'équation suivante :

$$PR = A \times 100 / L$$

Où :

A : valeur de l'angle de rotation en degrés d'angle

L : longueur du tube utilisé en millimètres

Signaler les pouvoirs rotatoires lévogyres par le signe négatif (-)

Indice de réfraction à 20°C

Définition

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'HE maintenue à une température constante. La longueur d'onde spécifiée est (589,3 + 0,3) nm, correspondant aux radiations D1 et D2 du sodium. = + 0,0004(t' - t) : valeur lue, à la température t', à laquelle a été effectuée la détermination. t : température de référence.

Calcul

L'indice de réfraction à la température de référence t est :

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0,0004 \times (t' - t)$$

Où la température de référence est de 20°C

Où :

$n_D^{t'}$: valeur de lecture

t : température de l'HE

Caractéristiques chimiques

Toutes les méthodes d'analyse et les formules présentées dans ce paragraphe proviennent du recueil de normes AFNOR [17].

Indice d'acide (IA)

Définition

Le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 gramme d'HE. La neutralisation des acides libres se fait par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée.

Calcul

$$\mathbf{IA = 56,11 \times V \times C / m}$$

Où :

V : volume en ml de KOH utilisé

m : masse en g de la prise d'essai

c : concentration exacte de KOH en mol/l

Indice d'ester (IE)

Définition

Le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans 1 gramme d'huile essentielle.

Calcul

$$\mathbf{IE = 28,05 / m \times (V_0 - V_1) - IA}$$

Où :

V₀ : volume en ml d'HCl pour le blanc ;

V₁ : volume en ml d'HCl pour la détermination ;

m : masse de la prise d'essai ;

IA : indice d'acide.

Identification thymol extrait

Toutes les méthodes d'analyse et les formules présentées dans ce paragraphe proviennent du recueil de **pharmacopée européenne 4^{ème} édition [125]**.

- Point de fusion
- Point d'ébullition

Le thymol peut se caractériser qualitativement par:

Réaction 1: en ajoutant à la solution aqueuse de thymol un demi-volume d'acide acétique glacial et ensuite, après mélange, 1 volume d'acide sulfurique monohydraté; si on est en présence de thymol, la solution se colore en rouge.

Réaction 2: Dissoudrez 0.2g de thymol dans 2 ml de solution alcalin diluée d'hydroxyde de Na, ajoutez 0.2 ml de chloroforme et chauffez au bain marie, la présence de thymol s'identifie par l'apparition d'une coloration violette.

Réaction 3: Dissolvez 2 ml environ de thymol dans 1 ml d'acide acétique anhydre, ajoutez 0.15 ml d'acide sulfurique et 0.05 ml d'acide nitrique, il apparaît une coloration vert – bleu en présence de thymol.

ANNEXE 3

File : C:\MSDCHEM\DATA\STAGIAIRES\THYN2.D
Operator : Bouslah
Acquired : 19 Nov 2007 9:59 using AcqMethod BLIDA
Instrument : Instrumen
Sample Name: thyn Ev509
Misc Info : thyn1Ev509
Vial Number: 1

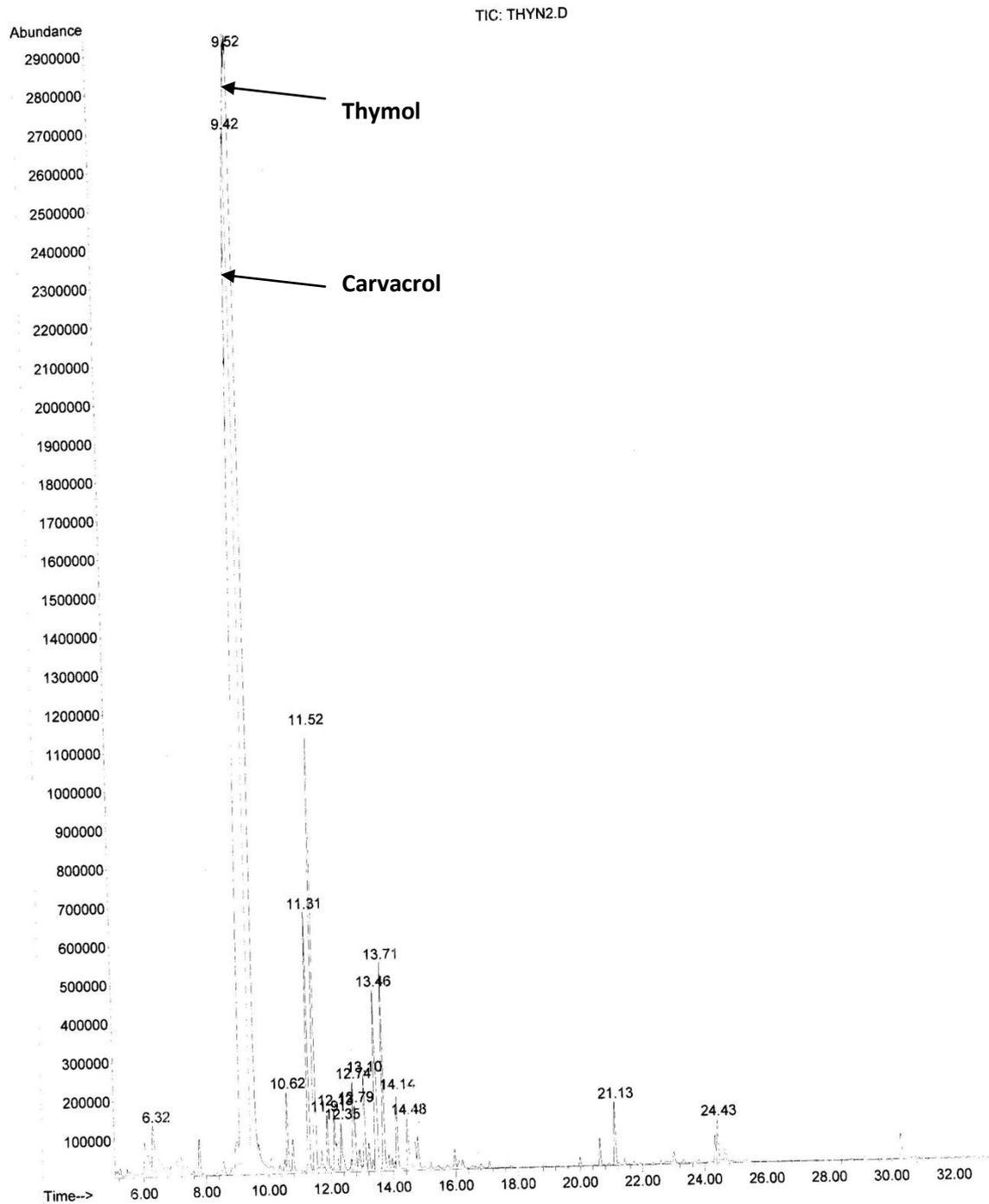


Figure 4 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. fontanesii* récolté au mois de mars extrait par entrainement à la vapeur d'eau

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\STAGIAIRES\2008\THYMB.D
Operator : Bouslah
Acquired : 11 Feb 2008 9:26 using AcqMethod BLIDA
Instrument : Instrumen
Sample Name: Thym B EH II
Misc Info : Thym B EH II
Vial Number: 1

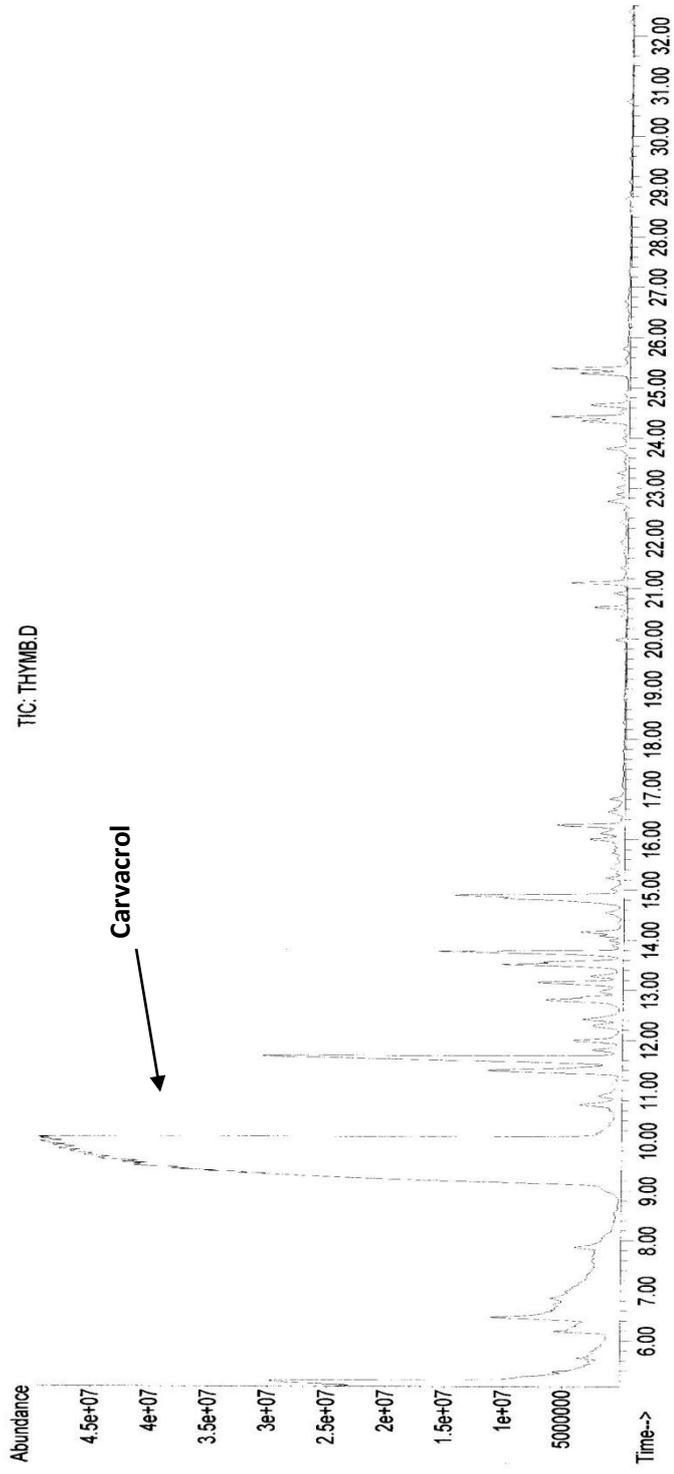


Figure 9: Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. fontanesii* récolté au mois de mars par hydrodistillation après l'extraction de thymol

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\TASTAG\AIRE\THYM.N.D
Operator : Boulsiah
Acquired : 20 Jan 2008 9:05 using AcqMethod BLIDA
Instrument : Instrumen
Sample Name: thymol naturel
Misc Info : thymol naturel
Vial Number: 1

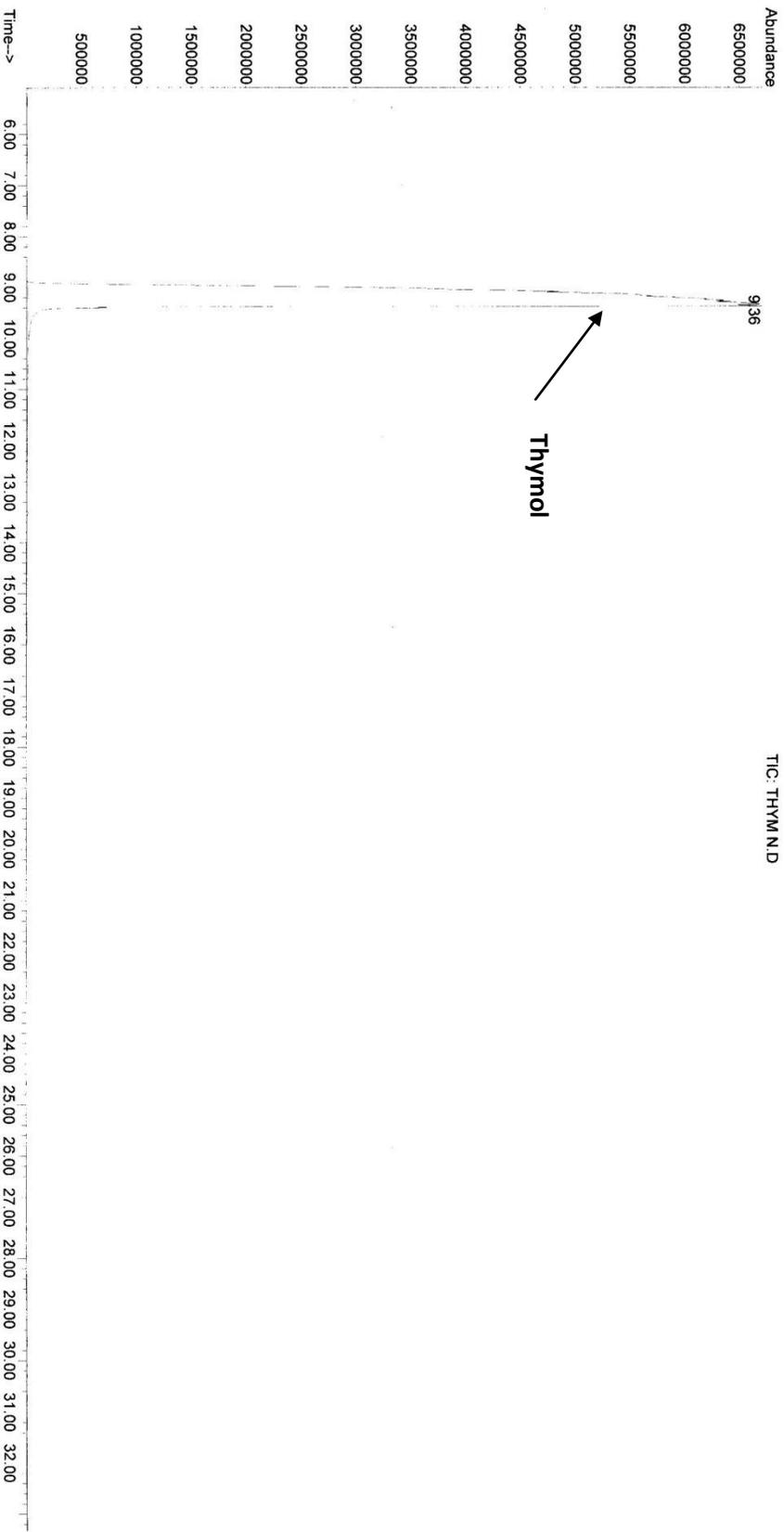


Figure 10 : Chromatogramme de Thymol extrait de l'huile essentielle de *T. fontanesii* (thymol naturel)

ANNEXE 4

MILIEUX DE CULTURE

MUELLER-HINTON gélosé (M-H) : (g/l)

Infusion de viande de bœuf.....	02,0g
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
Amidon.....	01.5g
Agar	10g
pH : 7.4	

Autoclaver pendant 15 min à 115°C

Milieu de MUELLER-HINTON liquide : (g/l)

Infusion de viande de bœuf.....	02,0g
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
Amidon.....	01.5g
pH : 7.4	

Autoclaver pendant 15 min à 115°C

Tryptone-soja-agar (TSA): (g/l)

Tryptone.....	15g
Peptone de soja.....	5g
Chlorure de Sodium	5g
Agar.....	15g

Autoclaver pendant 15 min à 121°C .

Eau physiologique 9% (NaCl)

Sodium Chloride (Fluka).....	9 g
H2O déminéralisée.....	1000 ml

Sabouraud gélosé simple (SAB) : (g/l)

Néopeptone.....	10g
Glucose.....	20g
Agar.....	20g
pH : 5-5,6	

Autoclaver pendant 15 min à 115°C .

Sabouraud liquide simple (SAB) : (g/l)

Néopeptone.....	10g
Glucose.....	20g
pH : 5-5,6	

Autoclaver pendant 15 min à 115°C .

Sabouraud actidione chlorophénicol (SAC) : (g/l)

Néopeptone.....	10g
Glucose.....	20g
Agar.....	20g
Actidione.....	0.5g
Chlorophénicol.....	0.5g
pH : 5-5,6	

Autoclaver pendant 15 min à 115°C .

Sabouraud dextrose agar (SDA) : (g/l)

Dextrose	40,0g
Peptone from casein	10,0g
Agar.....	15,0g
pH: 5.6 ± 0.2 at 25°C	

Autoclaver pendant 15 min à 121°C .

Sabouraud dextrose brouth (liquid): (g/l)

Dextrose	40,0g
Peptone from casein	10,0g
pH: 5.6 ± 0.2 at 25°C	

Autoclaver pendant 15 min à 121°C .

Mycobiotic Agar : (g/l)

Soy Peptone.....	10 g
Dextrose.....	10 g
Agar.....	15 g
Cycloheximide.....	0,4 g
Chloramphénicol.....	0,5g
pH 6,9 + 0,2	

Autoclaver pendant 10 min à 105°C .

Milieu de Borelli gélosé : (g/l)

Farine de blé.....	14 g
Lait écrémé en poudre	14 g
Miel pur	7 g
Agar.....	20 g
Chloramphénicol.....	1 g

pH = 7 ± 1.

Autoclaver pendant 10 min à 105°C .

Aromatogramme

Principe

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice d'agents antimicrobiens par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné de différents produits à tester [79] (figure 24). Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension du microorganisme à étudier. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antimicrobien. Plus il est petit, plus la souche est résistante.

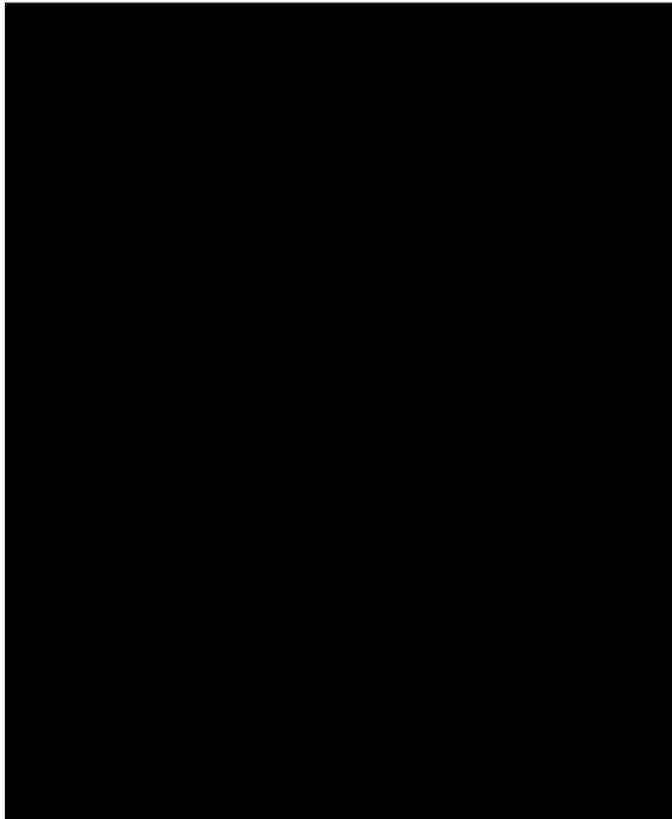


Figure 24 : Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988) [127].