



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ziane Achour – Djelfa
Facultés des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire en vue de l'obtention de diplôme de Magister en Biologie
Option : Contrôle de la Qualité et Analyses Alimentaires

Thème :

Caractérisation Chimique et évaluation des propriétés
antimicrobienne et antifongique « *in vitro* » des huiles
essentielles de *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. et de *Zyziphora*
hispanica L. de la région de Djelfa

Présenté par :

KACIMI ELHASSANI Mohamed

Soutenu devant le jury :

M. CHOUKRI Ali	Professeur	Président
M. LAHRECH Mokhtar Boualem	Professeur	Rapporteur
M. CHELGHOUM Chabane	Professeur	Examineur
M. BOUTAIBA Saad	Maître de Conférences B	Examineur
M. DAHIA Mustapha	Maître de Conférences B	Examineur

Année Universitaire 2011/2012

Remerciements

Il m'est particulièrement agréable de réitérer mes sincères remerciements et d'exprimer ma profonde gratitude au Professeur LAHRECH Mokhtar Boualem pour son indéfectible soutien aussi bien sur le plan humain que scientifique.

Mes vifs remerciements sont adressés au Professeur CHOUKRI Ali pour avoir bien voulu accepter de présider le jury de soutenance du présent travail.

Tout comme je remercie les membres du jury :

Pr CHELGHOUUM Chaabane, Dr BOUTAIBA Saad et Dr DAHIA Mustapha, m'ayant tant inspiré durant mon cursus universitaire, d'avoir accepté de juger mon travail de recherche.

Aussi, je voudrais assurer ma reconnaissance la plus profonde à mes parents pour les efforts louables et sincères qu'ils ont consentis tout au long des années de ma vie, efforts sans lesquels, le présent mémoire n'aurait pu voir le jour.

J'adresse également mes remerciements à Madame Maïdi L. pour les tous les efforts qu'elle a déployés.

Je remercie vivement mes étudiantes qui m'ont beaucoup aidé durant leur stage pratique au laboratoire de chimie organique et de substances naturelles.

Je ne saurais bien évidemment oublier dans mes remerciements Monsieur KHIREDDINE Ahmed dont les efforts soutenus pour m'assister dans la réalisation du présent manuscrit sont à signaler avec estime et reconnaissance.

Mes chaleureux remerciements s'adressent aussi à Monsieur SAHEL Boudjemaa qui s'est fait le plaisir de partager avec moi son éminent savoir-faire et qui n'a point manqué de me soutenir aux moments de stress.

Merci enfin au lecteur qui, par essence, justifie la rédaction de ce document

Dédicace

À mes parents.

Liste des abréviations

AFNOR : Agence Française de Normalisation

BHIB: Beef Heart Infusion Broth

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CPG /SM : chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

h: heure

H.E : huile essentielle

IRTF : Spectrométrie Infra Rouge par Transformée de Fourier

m : mètre

min : minute :

ml : millilitre

mm : millimètre

PAM : Plantes Aromatiques et Médicinales

PDA : Potatoes Dextrose Agar

PPAM : Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales

SM : Spectrométrie de Masse

TSA : Tryptic Soja Agar

UFC : unités formant colonies

µl : microlitre

µm : micromètre

°C : degré Celsius

% : pourcentage

∅ : Diamètre

Liste des figures

<i>Figure 1 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles</i>	9
<i>Figure 2: Mécanisme d'action de carvacrol sur la membrane cellulaire</i>	12
<i>Figure 3: Structure de la molécule d'isoprène</i>	16
<i>Figure 4: Structure de quelques composés des huiles essentielles</i>	17
<i>Figure 5: Image satellitaire LANDSAT UTM 2007 montrant la situation géographique d'endroit d'échantillonnage de Zyziphora hispanica</i>	31
<i>Figure 6: : Image satellitaire LANDSAT UTM 2007 montrant la situation géographique d'endroit d'échantillonnage de Thymus fontanesii</i>	32

Liste des tableaux

Tableau III.1: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> gratifiée par GC/MS _____	40
Tableau III.2 Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Zyziphora hispanica</i> gratifiée par GC/MS _____	41
Tableau III.3: Résultats de l'aromatogramme testant l'activité antibactérienne des huiles essentielles et de leurs mélanges _____	44
Tableau III.4: Résultats de l'aromatogramme testant l'activité antifongique des huiles essentielles et de leurs mélanges _____	46
Tableau III.5: Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> vis-à-vis des souches bactériennes _____	47
Tableau III.6 : Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de <i>Zyziphora hispanica</i> vis-à-vis des souches bactériennes _____	48
Tableau III.7: Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> vis-à-vis des souches fongiques _____	49
Tableau III.8: Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de <i>Zyziphora hispanica</i> vis-à-vis des souches fongiques _____	50
Tableau III.9: concentrations minimales bactéricides de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> contre les souches bactériennes _____	51
Tableau III.10: concentrations minimales bactéricides de l'huile essentielle de <i>Zyziphora hispanica</i> contre les souches bactériennes _____	51
Tableau III.11: Concentrations minimales fongicides de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> contre les souches fongiques CMF _____	52
Tableau III.12 Concentrations minimales fongicides de l'huile essentielle de <i>Zyziphora hispanica</i> contre les souches fongiques _____	52
Tableau III.13: Résultats du test des micro-atmosphères, évaluant l'activité antibactérienne des composés volatils de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> contre les souches bactériennes testées _____	53
Tableau III.14: Résultats du test des micro-atmosphères, évaluant l'activité antibactérienne des composés volatils de l'huile essentielle de <i>Zyziphora hispanica</i> contre les souches bactériennes testées, _____	54
Tableau III.15: Résultats du test des micro-atmosphères, évaluant l'activité antifongique des composés volatils de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> contre les souches fongiques testées _____	54
Tableau III.16: Résultats du test des micro-atmosphères, évaluant l'activité antifongique des composée volatils de l'huile essentielle de <i>Zyziphora hispanica</i> contre les souches fongiques testées _____	54

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
Chapitre I GÉNÉRALITÉS SUR LES HUILES ESSENTIELLES	6
I.1. Définition	7
I.2. Concepts généraux	7
I.3. Rôle physiologique	10
I.4. Mode d'action des huiles essentielles	10
I.5. Chimie des huiles essentielles	12
I.5.1. Premières investigations	12
I.5.2. Composition chimique des huiles essentielles	15
I.6. Activités des huiles essentielles	18
I.6.1. Industrie alimentaire	18
I.6.2. Désinfection des locaux	18
I.6.3. Activités pharmacologiques	19
I.6.4. Activité antioxydante	19
I.6.5. Activité anti-inflammatoire	20
I.6.6. Activités anti-microbiennes des huiles essentielles.	20
I.6.7. Activité liée à la composition chimique des huiles essentielles	21
I.7. Modes d'obtention des huiles essentielles :	23
I.7.1. Distillation : Hydrodistillation	23
I.7.2. L'entraînement à la vapeur sèche	23
I.7.3. L'extraction aux solvants volatils	24
I.7.4. L'extraction au CO ₂ supercritique	24
I.7.5. Extraction assistée par micro-ondes	24
I.8. Méthodes de détermination des constituants de l'huile essentielle	25
I.9. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne	26
I.9.1. Aromatogramme	26
I.9.2. Méthode de diffusion en puits	27
I.9.3. Méthode de dilution	27
I.9.3. Méthode de micro-atmosphère	28

Chapitre II MATÉRIEL ET MÉTHODES	29
II.1. Échantillonnage	30
II.1.1. Endroit d'échantillonnage	30
II.1.2. Préparation des échantillons	30
II.2. Obtention des huiles essentielles	30
II.2.1. Hydrodistillation	30
II.2.2. Extraction liquide – liquide	30
II.2.3. Évaporation rotative	33
II.3. Analyse Chromatographique	33
II.4. Micro-organismes étudiés	33
II.5. Procédure microbiologique	34
II.5.1. Aromatogramme	34
II.5.2. Micro-atmosphères	35
II.5.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI	35
II.5.4. Détermination des concentrations minimales bactéricides CMB et fongicides CMF	36
Chapitre III RÉSULTATS ET DISCUSSION	38
III.1. Rendement	39
III.2. Composition chimique	39
III.2.1. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	39
III.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Zyziphora hispanica</i>	41
III.3. Activités antimicrobiennes des huiles essentielles	43
III.3.1. Aromatogrammes	43
III.3.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)	46
III.3.3. Concentrations minimales bactéricides (CMB)	50
III.3.4. Micro-atmosphères	53
CONCLUSION GÉNÉRALE	56



INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Le thème du présent mémoire de magister s'inscrit dans le cadre des recherches menées sous l'intitulé « ressources naturelles ». Il est lui-même un volet du programme d'investigations structurant les activités du laboratoire de "chimie organique et de substances naturelles», qui dépend de la faculté des sciences de la nature et de la vie au sein de l'université de Djelfa.

À cet effet, la problématique générale qui s'impose pour traiter ce sujet, consiste à vouloir caractériser et valoriser quelques substances issues d'essences végétales spécifiques des milieux steppiques.

Les trois grands domaines sur lesquels s'ouvre le champ de recherche sont :

- les plantes aromatiques et médicinales, (PAM)
- les intrants et additifs pour améliorer la qualité de certains produits agroalimentaires
- et plus généralement, toute la chimie de la plante.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude, qui malgré son caractère académique, est quand même sous-tendue par un objectif d'applications pratiques "douces" sur le terrain. L'approche est telle que l'exploitation des ressources naturelles réponde au souci de la protection de l'environnement. Il y a, de toute évidence urgence à maintenir en l'état la biodiversité ainsi qu'un intérêt à instaurer un mode de développement durable.

Le secteur des "plantes aromatiques et médicinales" (PAM) connaît dans le monde une nette croissance. Ce secteur concerne majoritairement des marchés tels que la parfumerie, la cosmétique, l'aromathérapie et l'agroalimentaire.

Il est à signaler que malgré cet essor, le développement de cette filière demeure encore dans un état embryonnaire en Algérie.

La production des huiles essentielles est encore très majoritairement issue de la cueillette, ce qui induit des problèmes liés à la gestion en ce sens que c'est là un investissement non rentable face à la concurrence des produits importés.

Toutefois certaines ressources végétales particulières à notre pays (et dont on pourrait déterminer la composition chimique) peuvent offrir des avantages non négligeables, par le fait de leur facile disponibilité, leur faculté à fournir des huiles essentielles, ou extraits, largement demandés dans les industries.

L'isolation et l'identification de ces substances naturelles nécessitent en l'occurrence la mise en œuvre de diverses techniques analytiques qui permettent non seulement d'apprécier sa valeur marchande, mais aussi de réaliser le contrôle de la qualité ou encore de mettre en évidence une éventuelle spécificité. Cependant l'opération de caractérisation chimique de l'huile essentielle n'est pas toujours facile à réaliser compte-tenu de la complexité des composants de la plante étudiée. Ceux-ci peuvent être constitués de plusieurs dizaines de composés en proportions variables et pouvant présenter des structures et des fonctions chimiques très variées.

Aujourd'hui, de nombreux protocoles de laboratoire sont disponibles et les démarches adoptées sont différentes, suivant qu'il s'agit de repérer des composés connus et dont les caractéristiques spectrales sont disponibles ou lorsque l'objectif est de déterminer une structure non décrite dans la littérature.

D'une manière générale, quelque soient les résultats obtenus on ne peut déclarer une totale fiabilité qu'en procédant à des analyses complémentaires de confirmation.

Par ailleurs toute l'attention a été portée sur les capacités de ces huiles essentielles en matière de facultés antimicrobiennes (antibactérienne et antifongique). Ceci justifie que l'étude des activités biologiques et biotechnologique des extraits de plantes est d'une importance grandissante.

Cette fonction qualifiant les huiles essentielles est utilisée depuis des siècles mais n'a été reconnue réellement efficace qu'avec l'instauration des sciences biologiques au début du XXe siècle. Dans la lutte contre les infections, son application s'est

progressivement généralisée pour devenir depuis quelques dizaines d'années une véritable alternative aux antibiotiques de la pharmacopée courante.

Les huiles essentielles ont un très large spectre d'action inhibitrice puisqu'elles agissent aussi bien sur la prolifération des bactéries que sur celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est une caractéristique de leur composition chimique, principalement en raison du pouvoir bloquant de leurs éléments volatils majeurs. Cette capacité peut être mise à profit comme technique servant les opérations de conservation des aliments. Les huiles essentielles dont il est question peuvent être celles déjà éprouvées et homologuées par la *Food and Drug Administration*, ou alors celles qui sont "généralement reconnues comme agents additifs sains".

Les résultats de ce genre de travaux de recherche ont été déjà rapportés dans bon nombre de publications.

La flore de la steppe, très riche en plantes aromatiques, est donc riche en potentialités de production d'huiles essentielles, et semble être un réservoir inépuisable à prospecter.

C'est dans cette optique que se situe ce projet de mémoire dont les objectifs principaux peuvent se résumer comme suit :

- Du point de vue expérimentation, la présente étude se propose de mettre en évidence la composition chimique et de faire ressortir les activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. et de *Zyziphora hispanica* L. poussant à l'état spontané dans la steppe du sud algérois.
- Par ailleurs, le travail s'inscrit dans une démarche globale initiée depuis près de dix ans sous le terme de « métabolomique ». Ce concept est structuré sur la base d'une série de méthodes utilisées pour étudier ce qui est afférent aux métabolismes de tous les types d'organismes vivants et doit compléter les données obtenues par le génie génétique.

Note méthodologique

La méthode de travail se divise en deux parties : théorique et pratique :

La partie théorique comporte trois chapitres :

- Le premier chapitre donne un aperçu sur les huiles essentielles.
- Le deuxième chapitre approche par la bibliographie les méthodes usuelles d'obtention des huiles essentielles et leurs techniques d'analyse ainsi que les moyens requis pour ce faire.
- Le troisième chapitre décrit les plantes sujettes de l'étude.

La partie pratique comporte deux chapitres :

- Le quatrième chapitre concerne les manipulations au laboratoire, et relatives à :
 - l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.
 - la caractérisation de la composition chimique par GC/MS. (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse)
 - l'évaluation des activités antimicrobienne et antifongique sur huit bactéries (Gram+ et Gram-), trois champignons et une moisissure, en utilisant :
 - la technique d'antibiogramme
 - la technique des microatmosphères
 - la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)
- Le cinquième chapitre est réservé, quant à lui, à l'interprétation des résultats obtenus et aux applications possibles sur les aliments à forte teneur de corps gras et sur d'autres denrées dont la conservation est difficile. Comme aux applications dans les pommades cosmétiques en tant que principes actifs ou encore à proposer pour des études ultérieures relatives à la pharmacopée pour les qualités antibiotiques curatives.

Ce chapitre débouche également sur l'ouverture des discussions quant aux éventuelles applications et perspectives qui pourraient s'inscrire dans ce champ de recherches.



Chapitre I
GÉNÉRALITÉS SUR LES
HUILES ESSENTIELLES

I. Généralités sur les huiles essentielles

I.1. Définition :

D'après Naves, aucune des définitions des huiles essentielles n'a le mérite de la clarté, ni celui de la précision. Cet auteur définit les huiles essentielles comme des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau.

Cette définition peut être étendue aux huiles essentielles obtenues par expression à froid d

e l'écorce ou zeste des fruits de Citrus, à cause de l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour entraîner le produit libéré des alvéoles oléifères.

Ces définitions ont été reprises à peu de choses près par l'AFNOR: ce sont des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques.¹

I.2. Concepts généraux

Le terme huiles essentielles (HE) dérive de « quinta essentia », un nom donné par le médecin suisse Paracelsus aux extraits de plantes obtenues par distillation, il signifie la fragrance et la quintessence de la plante.²

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras (lipides), et ne sont pas « essentielles » dans le sens qu'elles sont nécessaires à la croissance ou au métabolisme. Ce sont des composés aromatiques volatils, qui ont un aspect huileux, elles sont obtenues à partir de plantes aromatiques par plusieurs procédés d'extraction.³ Elles sont

¹ Garnero J, 2002, Huiles essentielles, Techniques de l'Ingénieur, K 345-1 : 1.

² Hart K.J., Yáñez-Ruiz D.R., Duval S.M., McEwan N.R., Newbold C.J., 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 147 : 8–35

³ Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94 : 223–253

solubles dans les lipides et les solvants organiques et possèdent une densité inférieure à celle de l'eau.⁴

Approximativement 3000 huiles essentielles sont connues, alors que 300 sont commercialement importantes. Grâce à leurs activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires et à leurs fragrances, les huiles essentielles sont utilisées dans les domaines pharmaceutique, alimentaire, cosmétique... Néanmoins, une seule huile peut avoir plusieurs utilisations à la fois.³

Le rendement et la composition des huiles essentielles varient selon l'environnement (température, salinité, pluviosité...), la période de récolte (saison, stade de développement), l'état de plante (fraîche ou séchée) et la technique d'extraction (hydrodistillation, entraînement à la vapeur d'eau, extraction par solvant...). Ces variations sont aussi observées entre les huiles essentielles extraites des différentes parties de la même plante (feuilles, fleurs, tiges, graines et racines).^{5,6} De même que des huiles essentielles extraites des feuilles de coriandre (*Coriandrum sativum*) sont différentes des huiles extraites des graines de la même plante.⁷

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, rhizomes, fruits et graines. La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées (Figure 1). Les huiles essentielles sont synthétisées dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent dans des cellules glandulaires recouvertes d'une cuticule. Les cellules endodermales se situent toujours à l'abri de ces substances, grâce à la présence d'un autre type de cellules appelées les cellules de gardes. La forme et le nombre des structures histologiques sécrétrices varient d'une famille botanique à l'autre et même

⁴ Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chemical Toxicology*. 46 : 446–475

⁵ Dorman H.J.D., Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88 : 308–316

⁶ Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J., 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*. 135 : 1893–1902

⁷ Delaquis R.J., Stanich K., Girard B., Massa G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 74 : 101–109

d'une espèce à une autre. Néanmoins, plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce.⁸ Les trichomes glandulaires sont les formes les plus répandues, ils représentent à la fois le site de biosynthèse et de stockage des huiles essentielles.⁹

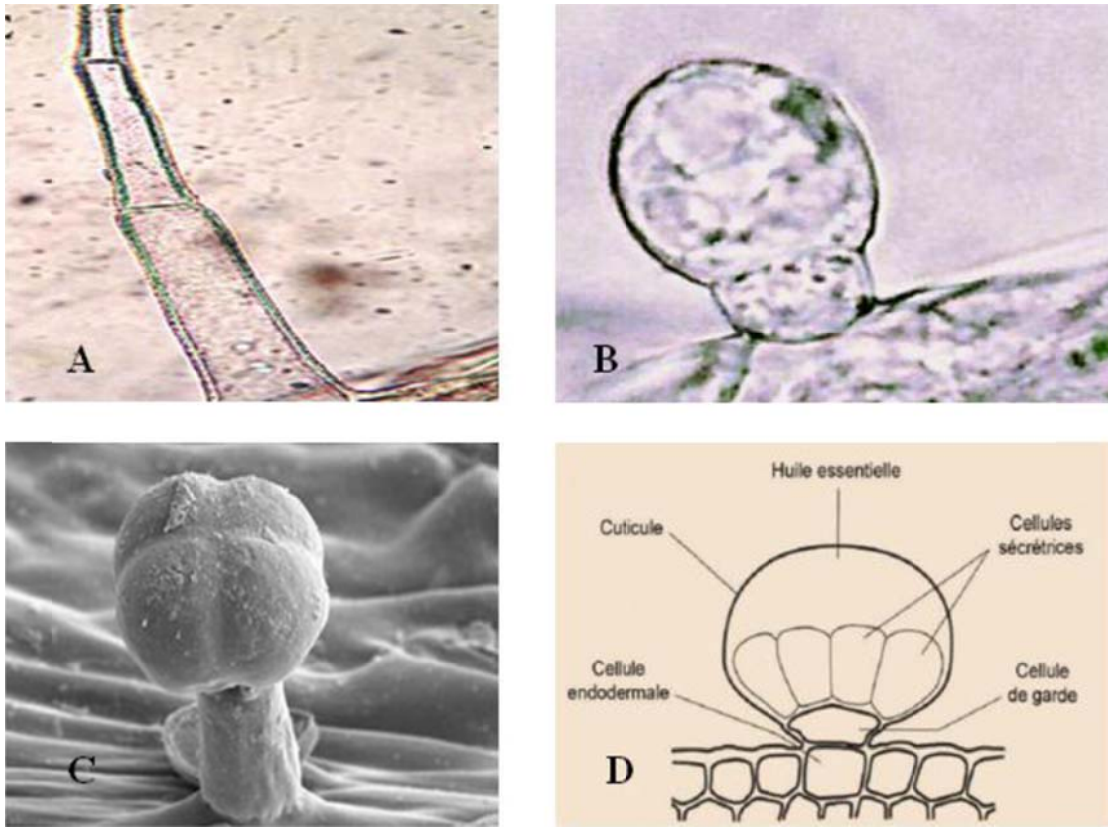


Figure 1 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles

(A) : poil sécréteur de *Mentha pulegium*, (B) : trichome glandulaire de *Mentha pulegium*,

(C) : trichome glandulaire de *Lippia scaberrima* et (D) : structure de trichome glandulaire de *Thymus vulgaris*^{7,8}.

⁸ Karray-Bouraoui N., Rabhi M., Neffati M., Baldan B., Ranieri A., Marzouk B. et al., 2009. Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. *Industrial Crops and Products*. 30 : 338–343

⁹ Combrinck S., Du Plooy G.W., Mccrindle R.I., Botha B.M., 2007. Morphology and Histochemistry of the Glandular Trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of botany*. 99 (6) : 1111–1119

I.3. Rôle physiologique :

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu.¹⁰

Certainement plusieurs effets apparents " utiles" ont été décrits: réduction de la compétition des autres espèces de plante (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines, et protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides, et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux.¹¹

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservent l'humidité des plantes dans les climats désertiques.¹²

I.4. Mode d'action des huiles essentielles

Plusieurs théories sont proposées pour expliquer le mécanisme par lequel les huiles essentielles exercent leur activité antimicrobienne. La composition complexe des huiles essentielles tend à prouver que cette activité serait due à plusieurs mécanismes d'action différents, liés à la nature chimique de ces composés.^{3,13,14}

La plupart des mécanismes d'action sont attribués à l'interaction des composants des huiles essentielles avec la membrane cellulaire.²¹ Les huiles essentielles sont constituées de molécules lipophiles capables de pénétrer la double couche phospholipidique, leur accumulation entre les phospholipides entraîne alors un changement de conformation et un mauvais fonctionnement

¹⁰ Rai M. K. , Acharya D. et Wadegaonkar P. (2003) Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants, In: Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects, Haworth press, N-York, Londin, Oxford. 165-1 85.

¹¹ Porter N. (2001) Essential oils and their production. Crop & Food research. Number 39.

¹² Belaïche P., (1979) traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1. L'Aromathérapie. Ed. Maloine S.A. Paris.

¹³ Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V., 2002. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 46 : 1914–1920.

¹⁴ Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K., Nychas G.J.E., 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on Escherichia coli O157:H7. Italian Journal of Food Science. 13 (1) : 65–75.

de la membrane cellulaire, perturbant ainsi le transport membranaires des substances nutritives.^{15,16} Les huiles essentielles peuvent aussi perturber le gradient ionique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique ce qui diminue la stabilité membranaire et perturbe aussi le transport membranaire. Mais certaines bactéries sont capables de contrebalancer cet effet par l'utilisation de la pompe ionique, dans ce cas la croissance ralentit grâce à l'épuisement de l'énergie de la pompe.^{16,17,18} Un mécanisme d'action proposé implique le groupement hydroxyle des phénols, comme le carvacrol, qui agirait comme un transporteur transmembranaire des cations et des protons monovalents, cet effet perturbe le gradient ionique et le fonctionnement membranaire des cellules microbiennes (Figure 4).¹⁹

D'autres mécanismes d'action sont liés à la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines.²⁰ Les huiles essentielles extraites de cannelle et de l'ail peuvent inhiber l'activité enzymatique des bactéries du rumen telle l'espèce *Enterobacter aerogenes*. D'autres huiles essentielles inhibent la croissance microbienne par l'inactivation des acides nucléiques.²¹

L'action des huiles essentielles dépend aussi de la nature des microorganismes ciblés. Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'action des huiles essentielles, par rapport aux bactéries à Gram négatif. Cela peut être expliqué par la présence de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, elle représente en effet une barrière capable de diminuer la perméabilité des

¹⁵ Sikkema J., Bont J.A.M., Poolman B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 269 : 8022–8028

¹⁶ Ultee A., Kets E.P., Smid E.J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4606–4610

¹⁷ Cox S.D., Mann C.M., Markam J.L., 2001. Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*. 91 : 492–497

¹⁸ Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.L., 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragrance Journal*. 14 : 322–332

¹⁹ Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 : 1561–1568

²⁰ Gustafson R.H., Bowen R.E., 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology*. 83 : 531–541

²¹ Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A., 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90 : 2580–2595

composés hydrophobes.²¹ Cependant, les molécules à faible poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent traverser cette barrière.^{5,19}

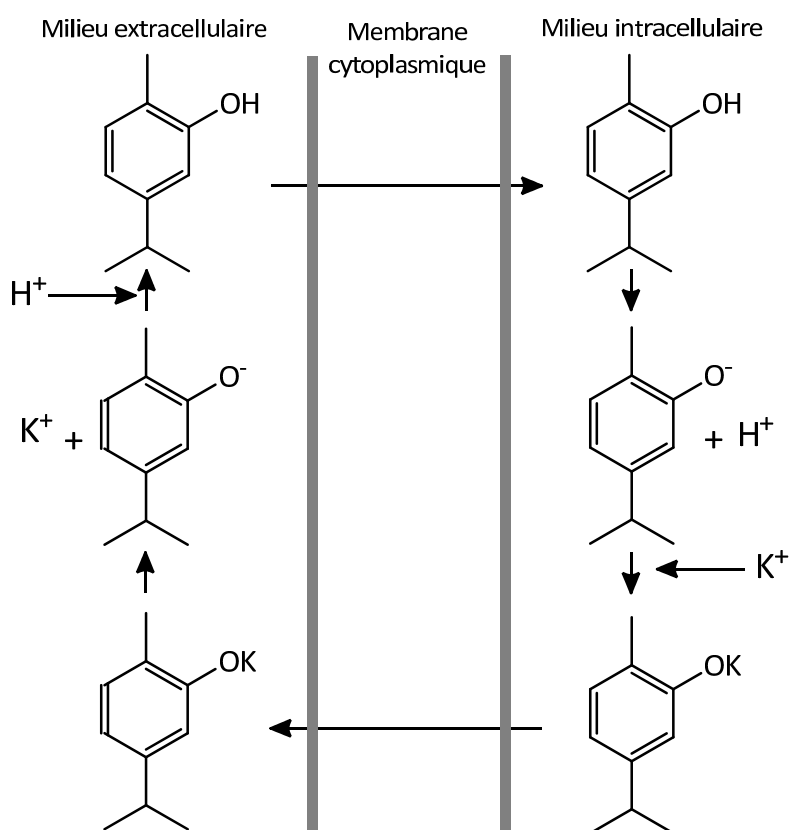


Figure 2: Mécanisme d'action de carvacrol sur la membrane cellulaire¹⁹

I.5. Chimie des huiles essentielles

I.5.1. Premières investigations

Les premières investigations systématiques des constituants des huiles essentielles pourraient être attribuées au chimiste français M.J. Dumas (1800-1884) qui analysa quelques hydrocarbures ainsi que quelques composés contenant de l'oxygène, du soufre et de l'azote. Il publia ses travaux en 1883.²²

Le chercheur français M. Berthelot caractérisa plusieurs substances et étudia les produits de leurs réarrangements par le biais de leurs pouvoirs rotatoires.²³

²² Dumas, M.J., 1833. Ueber die vegetabilischen Substanzen welche sich dem Kampfer nähern, und über einig ätherischen Öle. *Ann. Pharmacie*, 6: 245-258.

²³ Berthelot, M. 1859. Ueber Camphenverbindungen. *Liebigs Ann. Chem.*, 110: 367-368.

Cependant, les investigations les plus intéressantes furent réalisées par O. Wallach qui s'était rendu compte que plusieurs terpènes, différemment décrits selon leurs sources botaniques, étaient, en effet, chimiquement identiques. Il tenta alors d'isoler les composés des huiles essentielles et d'étudier leurs propriétés. Il fit appel à la distillation fractionnée à fin d'extraire les huiles essentielles et effectuer ensuite des réactions avec des réactifs inorganiques pour caractériser les fractions obtenues.

À cette époque-là, les hydrocarbures présents dans les huiles essentielles et ayant pour formule brute : $C_{10}H_{16}$ furent connus et eurent nommés terpènes en raison de leur présence dans l'huile de térébenthine.

Les composés ayant pour formules brutes : $C_{10}H_{16}O$ et $C_{10}H_{18}O$ furent également connus à cette même époque sous le nom générique de « camphre ».

En 1891, Wallach caractérisa les terpènes suivants : camphène, pinène, dipentène, phellandrène, terpinolène, fendiène et sylvestrène, ceci fut reconnu pour être un artefact.

De 1884-1914, Wallach publia environ 180 articles qui furent rassemblés dans son livre *Terpene und Campher* et suggéra même en 1887 que les terpènes fussent synthétisés à partir d'unités d'isoprène.²⁴

En 1910, il fut honoré par le Prix Nobel de Chimie « en reconnaissance de ses éminentes recherches en chimie organique notamment dans le domaine des composés alicycliques ».²⁵

Le chimiste allemand A. von Baeyer déploya, dès 1893, de grands efforts dans ses recherches sur les structures et les propriétés des terpènes cycliques, efforts qui furent couronnés par le Prix Nobel de Chimie « en reconnaissance de ses contributions au développement de la chimie organique et de la chimie

²⁴ Wallach, O. 1914. *Terpene und Campher*, 2nd ed., Leipzig: Veit & Co.

²⁵ *Nobel Lectures, Chemistry 1901-1921*. 1966, Elsevier Publishing Company, Amsterdam. 1966 :178-194.

industrielle par ses recherches sur les teintures organiques et les composés hydro-aromatiques ». ²⁶

Une amélioration significative en termes d'identification de structure fût l'application de la déshydrogénation des sesqui et di terpènes à l'aide du sulfure puis du sélénium pour former des composés aromatiques. ²⁷

La structure du sesquiterpène β -carophyllene bicyclique demeura inconnue pendant plusieurs années jusqu'à ce que W. Tiebs fût parvenu, après de nombreuses investigations à l'isoler à partir des produits d'auto-oxydation de l'huile de clou de girofle. ²⁸

F. Šorm et al suggérèrent que le caryophyllene pût avoir un cycle à quatre et un autre à neuf par le biais de la spectroscopie Infrarouge, ²⁹ ce qui fut ensuite confirmé par le chimiste anglais D.H.R. Barton qui reçut le Prix Nobel de Chimie en 1969. ³⁰

L'utilisation de la spectroscopie ultraviolette dans l'identification des structures des terpènes et autres produits naturels par R.B. Woodward au cours des années quarante du siècle dernier. Les données empiriques conduisirent à la mise au point d'une série de règles (appelées plus tard règles de Woodward) qui purent servir à identifier les structures de composés nouveaux par corrélation entre la longueur d'onde du maximum d'absorption et le comportement de substitution d'un diène ou d'une énone. ³¹

Woodward reçut le Prix Nobel de Chimie en 1965. ³²

²⁶ von Baeyer, A. and O. Seuffert, 1901. Erschöpfende Bromierung des Menthons. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 34:40-53.

²⁷ Ruzicka, L. 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9: 357–396.

²⁸ Treibs, W. 1952. Über bi- und polycyclische Azulene. XIII. Das bicyclische Caryophyllen als Azulenbildner. *Liebigs Ann. Chem.*, 576: 125–131.

²⁹ Šorm, F., L. Dolejš, and J. Pliva, 1950. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, 3: 187.

³⁰ Barton, D.H.R. and A.S. Lindsay, 1951. Sesquiterpenoids. Part I. Evidence for a nine-membered ring in caryophyllene. *J. Chem. Soc. [London]*, 1951: 2988–2991.

³¹ Woodward, R.B. 1941. Structure and the absorption spectra of α , β -unsaturated ketones. *J. Am. Chem. Soc.*, 63: 1123–1126.

³² *Nobel Lectures, Chemistry 1963-1970*. 1972 Elsevier Publishing Company, Amsterdam. 1972 : 100-121.

Cependant, ce fut le développement de la chromatographie et de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire qui aboutit à l'élucidation des structures d'autres composés des huiles essentielles.

Le développement quasi exponentiel dans le domaine des huiles essentielles est notamment dû au progrès remarquable des méthodes d'analyse au cours du dernier demi-siècle.

I.5.2. Composition chimique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles représentent un mélange complexe de molécules chimiques qui peuvent comporter plus de soixante composants différents, parmi lesquels deux ou trois sont des composants majeurs constituant de 20 à 70% du mélange comparativement aux autres qui se trouvent le plus souvent sous forme de traces. À titre d'exemple, le carvacrol et le thymol sont les composants majeurs de l'huile d'*Origanum compactum*, le linalol pour l'huile de *Coriandrum sativum*, le menthol et le menthone pour l'huile de *Mentha piperita*. Généralement ces composants majeurs déterminent les propriétés biologiques de l'huile essentielle.³

La plupart des composants des huiles essentielles sont inclus dans deux groupes : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes, les deux sont synthétisés à travers deux voies métaboliques séparées.^{33,34}

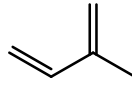
Les terpénoïde

Ils représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires, végétaux, plus de 15.000 composés différents sont décrits dans la littérature. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C₅H₈), communément appelée isoprène (Figure 2). Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en : monoterpénoïdes (C₁₀), sesquiterpénoïdes (C₁₅) et diterpénoïdes (C₂₀). Dans la composition de la plupart des huiles

³³ Amlan K., Patra J.S., 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 71 : 1198–1222

³⁴ Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A., 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90 : 2580–2595

essentielles les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes forment la majeure partie (Figure 3).^{21,35}



isoprene

Figure 3: Structure de la molécule d'isoprène²¹

Les phénylpropanoïdes

Ils sont moins fréquents par rapport aux terpénoïdes. Néanmoins, certaines plantes possèdent ces composés avec des proportions significatives. Les phénylpropanoïdes dérivent majoritairement de la phénylalanine.

Ils sont constitués d'une chaîne carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones (Figure 3).³⁶

³⁵ Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A. et al., 2008. Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*. 145 : 209–228

³⁶ Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwan R.S., 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. 34 : 3–21

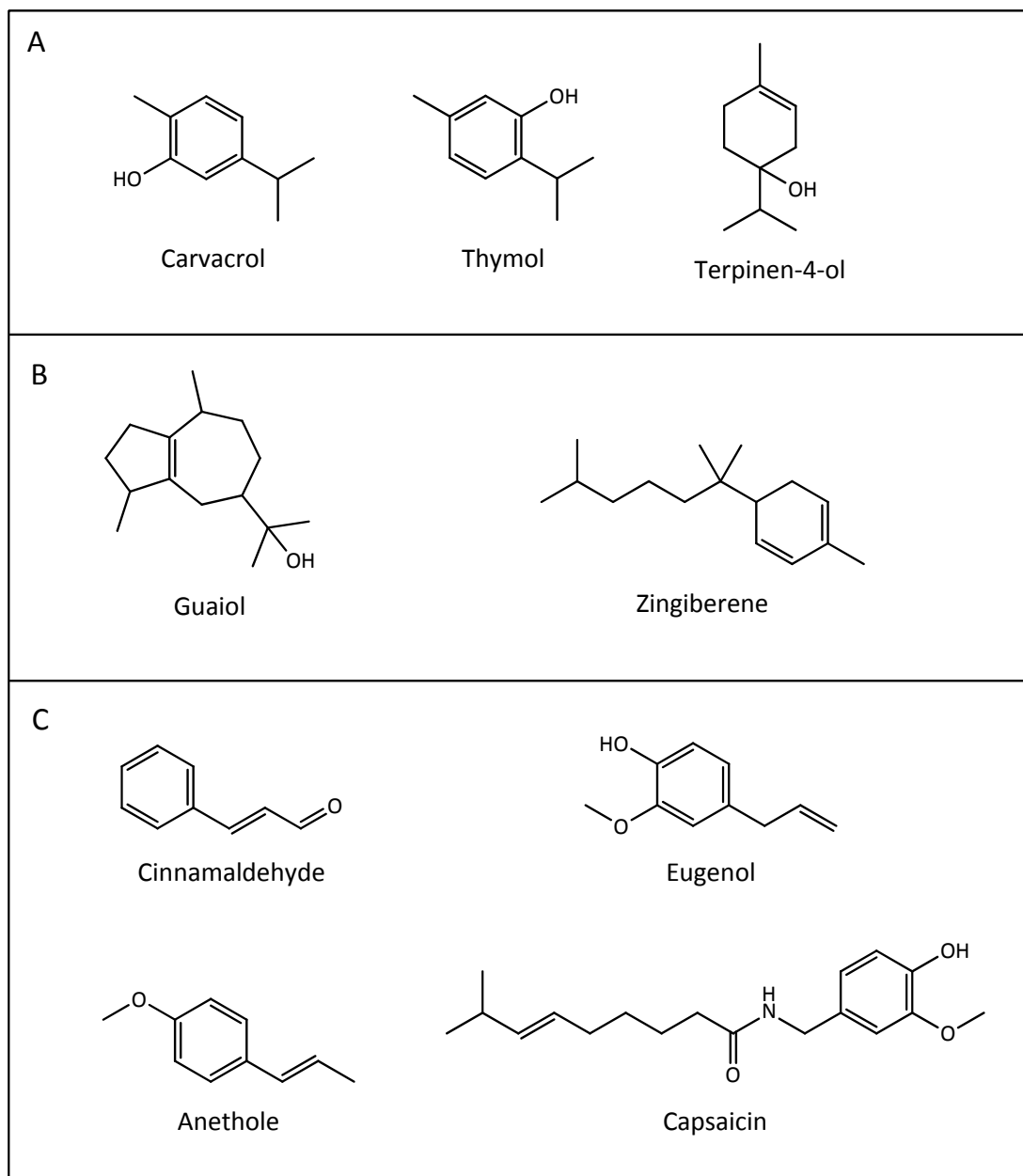


Figure 4: Structure de quelques composés des huiles essentielles
(A) : monoterpénoïdes, (B) : sesquiterpénoïdes et (C) : phénylpropanoïdes²¹

I.6. Activités des huiles essentielles

I.6.1. 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.³⁷

Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles 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.^{38,39,40,41}

I.6.2. 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.⁴²

³⁷ 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

³⁸ 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

³⁹ 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

⁴⁰ 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

⁴¹ 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

⁴² de Billerbeck V-G- Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques – Phytothérapie; Vol. 5; pp 249–253. 2007

I.6.3. 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.⁴³

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.⁴⁴

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.^{45,46}

I.6.4. 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.⁴⁷ Le thymol et le carvacrol sont les composés les plus actifs.⁴⁸

⁴³ 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

⁴⁴ 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

⁴⁵ 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

⁴⁶ 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

⁴⁷ 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

⁴⁸ 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

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/nérol, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes: γ -terpinène et l' α -terpinolène.⁵⁷

Une étude portant sur l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a montré 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.⁴⁹

I.6.5. 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.⁵⁰ 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.⁵⁷

I.6.6. 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 XIXe et au début du XXe siècle, plusieurs travaux scientifiques relataient l'action antiseptique de plusieurs huiles essentielles.⁵¹

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

⁴⁹ Jukić M. et Miloš M- Catalytic oxidation and antioxidant properties of thyme essential oils (*Thymus vulgaris* L.)- *Croatia Chemica Acta* ; Vol. 78; N°1; pp 105-110.2005

⁵⁰ Inouye S, Abe S - Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse- *Phytothérapie*; Vol. 1; pp 2-4. 2007

⁵¹ 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

opportunistes. Elles présentent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.⁵²

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.^{52 53 54 55}

L'activité antifongique de onze huiles essentielles a été évaluée contre cinq levures de pourritures d'aliments : *Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Yarrowia lipolytica*. Les résultats obtenus ont montré que les huiles essentielles de *Thymus citriodorus* 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.^{56,57}

1.6.7. Activité liée à la composition chimique des huiles essentielles

Le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans les huiles essentielles. Ainsi in vitro, une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison des terpènes hydrocarbures a été observée. La structure moléculaire semble présenter un rôle aussi important que la présence d'oxygène dans la molécule

⁵² 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

⁵³ 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

⁵⁴ 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

⁵⁵ 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

⁵⁶ Feng W et Zheng X - Essential oils to control *Alternaria alternaria* in vitro and in vivo- Food Control; Vol. 18; pp 1126-1130.2007

⁵⁷ 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

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.⁶³

Sur cette base, l'ordre d'activité antimicrobienne de ces composés est le suivant:

Phénols >Alcools> Aldéhydes> Cétones> Oxydes> Hydrocarbure > Esters.⁵⁴

Il a été prouvé que plus les teneurs phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces⁵⁸.

Les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques dans des préparations pharmaceutiques.⁵⁹

Il a été également prouvé que le thymol est 20 fois plus antiseptique que le phénol.⁶⁰

D'autres études ont montré que l'activité (antimicrobienne, antivirale, insecticide, larvicide et ovicide) des huiles essentielles est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément.⁶¹

Dans une étude in vitro sur des microbes pathogènes situés dans les aliments, il a été montré que la totalité des huiles essentielles ont une plus grande activité antimicrobienne que les mélanges des composants majeurs, et que les composants mineurs sont critiques à l'activité et peuvent avoir un effet synergique ou une influence potentielle sur l'huile essentielle.⁶² Ceci a été encore prouvé par l'étude de l'activité antifongique de deux espèces de thym,

⁵⁸ 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

⁵⁹ 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

⁶⁰ 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

⁶¹ Lahlou M-Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils- *Phytotherapy research*; Vol.18; pp 435-448. 2004

⁶² 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

où il a été 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% ce qui permet de conclure que d'autres constituants pourraient intervenir dans le pouvoir antifongique de cette huile.⁶³

En revanche, les composants oxygénés purs ont aussi montré une activité supérieure par rapport aux huiles essentielles dans lesquelles ils se trouvent. Les résultats des tests de l'activité de carvacrol, de p-cymène et de γ-terpinène sur *Candida spp.*, sur *Aspergillus spp* et autres dermatophytes ont montré 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.⁶⁴

I.7. Modes d'obtention des huiles essentielles :

I.7.1. Distillation : Hydrodistillation

La distillation est la méthode la plus employée pour extraire les huiles essentielles.

Les extraits végétaux sont chauffés jusqu'à ébullition; l'huile essentielle s'évapore alors avec les vapeurs dégagées, puis est condensée (elle redevient liquide lorsqu'on la refroidit) et séparée de l'eau.⁶⁵

I.7.2. L'entraînement à la vapeur sèche

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats, le procédé de l'entraînement à la vapeur sèche a été mis au point. La masse végétale repose sur une grille vers laquelle la vapeur sèche est pulsée. Les cellules se distendent et les particules d'huile se libèrent. Ces dernières sont alors

⁶³ Haddaf Y, Kaloustian J, Giordan R, Regli P, Chefrou 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- 6e symposium international d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales ; Grasse, France. 2004

⁶⁴ 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

⁶⁵ Benmetton J, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, monoterpènes et sesquiterpènes; TEC & DOC, 3eme édition, pp 484-497. Lavoisier. Paris. 1999

vaporisées et condensées dans un serpentin réfrigéré. La récupération de l'huile essentielle est la même que dans le cas de l'hydrodistillation.

I.7.3. L'extraction aux solvants volatils

Cette technique est elle aussi utilisée avec des fleurs ne supportant pas la chaleur, la distillation ne convient que pour les végétaux dont le rendement en huile essentielle est suffisamment important, les solvants très volatils par exemple l'éther et l'hexane qui s'évaporent rapidement sont employés. Le solvant lave la matière première qui subira après décantation et concentration, une distillation partielle. Ce solvant volatil est alors séparé de la "concrète" par filtrage, puis glaçage de -12°C à -15°C. La précieuse substance ainsi obtenue est à nouveau filtrée et concentrée à faible pression.

I.7.4. L'extraction au CO₂ supercritique

Il s'agit d'un procédé récent d'extraction à froid des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique, le CO₂, Sous pression et à température supérieure à 31°C, le gaz carbonique se trouve dans un état "supercritique", la matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO₂ est introduit sous pression et réfrigéré. Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion. La pression y étant réduite, le CO₂ reprend sa forme gazeuse et est complètement éliminé. L'extrait végétal est isolé, les matières premières ainsi obtenues sont proches du produit naturel d'origine sans trace résiduelle de solvant.

I.7.5. Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques condensation, refroidissement, et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain

de temps d'extraction, l'utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction important.⁶⁶

I.8. Méthodes de détermination des constituants de l'huile essentielle

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques.⁶⁷ 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.^{68,69,70}

Le couplage CPG/SM est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. 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

⁶⁶ HEMWIMON S., PAVASANT P. & SHOTIPRUX A. (2007).Microwar-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of Morinda Citrofolia.Separation and purification Technology, 54,44-50

⁶⁷ Cavalli J.F -Caracterisation 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

⁶⁸ 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

⁶⁹ 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

⁷⁰ Lahlou M-Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils- Phytotherapy research; Vol.18; pp 435-448. 2004

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.³⁹

I.9. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à de faibles concentrations.

I.9.1. Aromatogramme

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé. La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à

étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'huile essentielle sur le germe testé.

On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité.⁷¹

I.9.2. Méthode de diffusion en puits

Méthode proposée par Cooper & Woodman en 1946 et reprise par Shroeder et Messing en 1949. Elle assure une diffusion radiale de l'huile essentielle à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'huile essentielle de concentration connue. L'huile essentielle diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne⁷².

I.9.3. Méthode de dilution

Les huiles essentielles à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut-être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu⁷³.

⁷¹ GUÉRIN-FAUBLÉE (V.) et CARRET (G.) : L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées nationales GTV-INRA, 1999, 5-12

⁷² Tagg J.R. et McGiven A.R. (1971). Assay system for bacteriocins. J. Appl. Microbiol. 21: 943

⁷³ Robert.D., (1995), Méthodes de dilutions, In *Antibiotiques et antibiogrammes* : 131- 137

I.9.3. Méthode de micro-atmosphère

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes de Pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'huile essentielle qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée après fixation de l'huile essentielle sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés.⁷⁴

⁷⁴ PIBIRI M.C., (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctorat. Polytechniques Fédérale de Lausanne



CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les plantes sujettes de l'étude ont fait l'objet de plusieurs manipulations, le présent chapitre décrit les méthodes et le matériel utilisés.

II.1. Échantillonnage

II.1.1. Endroit d'échantillonnage :

Les deux échantillons de plantes ont été prélevés durant le mois de mars de la région de Haouas.

Les endroits à partir desquels les plantes ont été cueillies, sont montrés sur les figures 5 et 6, images satellitaires LANDSAT UTM 2007 ayant fait l'objet d'un traitement de la composition colorée des bandes : proche – infrarouge, infrarouge et vert avec une projection correspondant à l'UTM ED 50, fuseau 31.

II.1.2. Préparation des échantillons :

La matière végétale a subi un séchage à l'air libre et a été ensuite gardée dans un endroit sec.

II.2. Obtention des huiles essentielles

II.2.1. Hydrodistillation :

Chaque hydrodistillation a duré deux heures et demi, le distillat est récupéré dans un récipient, ce dernier est ensuite scellé avec du parafilm, et gardé au frais et à l'obscurité.

II.2.2. Extraction liquide – liquide :

Trois extractions liquide – liquide du distillat sont effectuées à l'aide de l'éther diéthylique en vue d'extraire l'huile essentielle depuis la phase aqueuse dans laquelle elle se trouve initialement vers la phase organique extractrice.

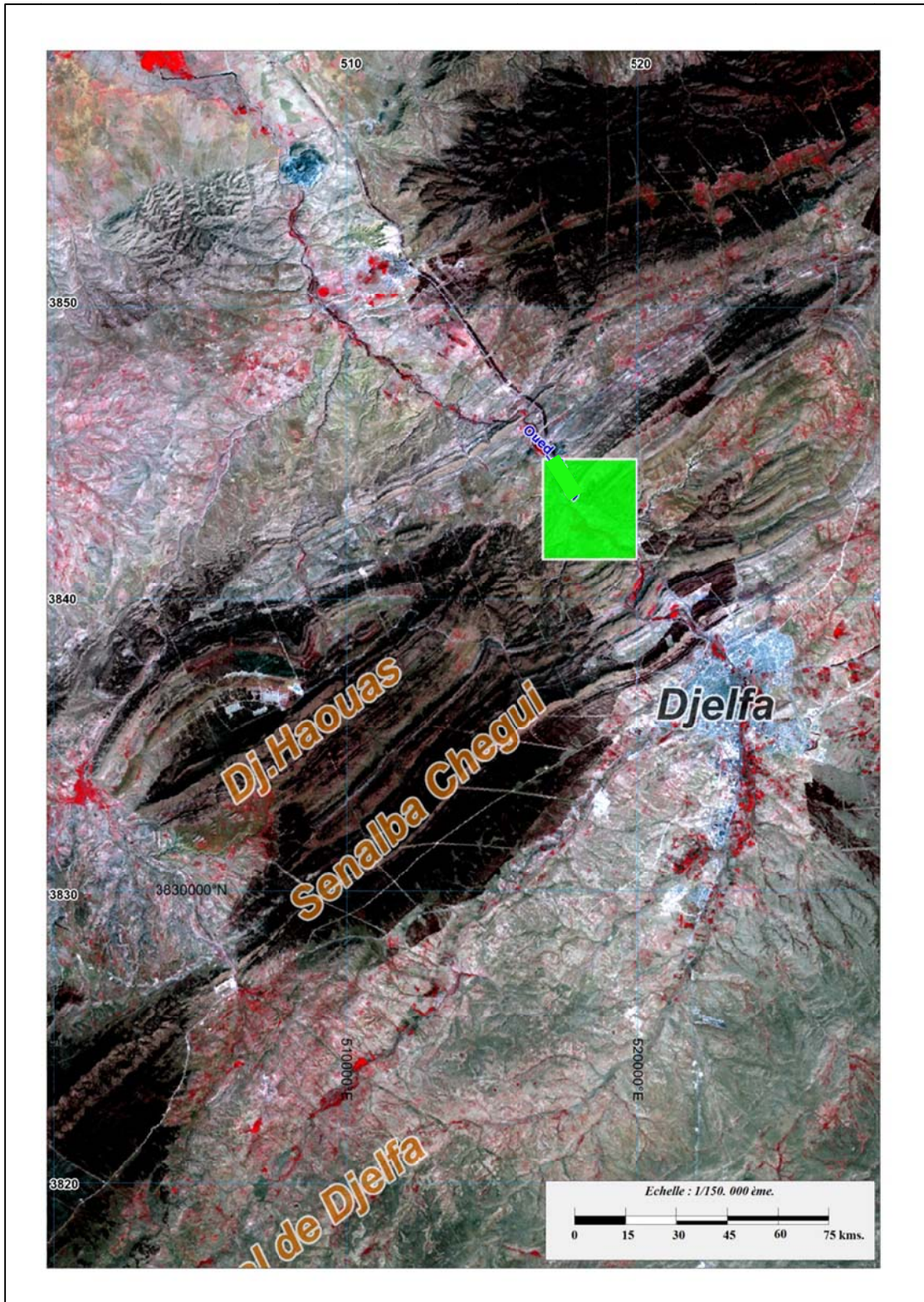


Figure 5: Image satellitaire LANDSAT UTM 2007 montrant la situation géographique d'endroit d'échantillonnage de *Ziziphora hispanica*.

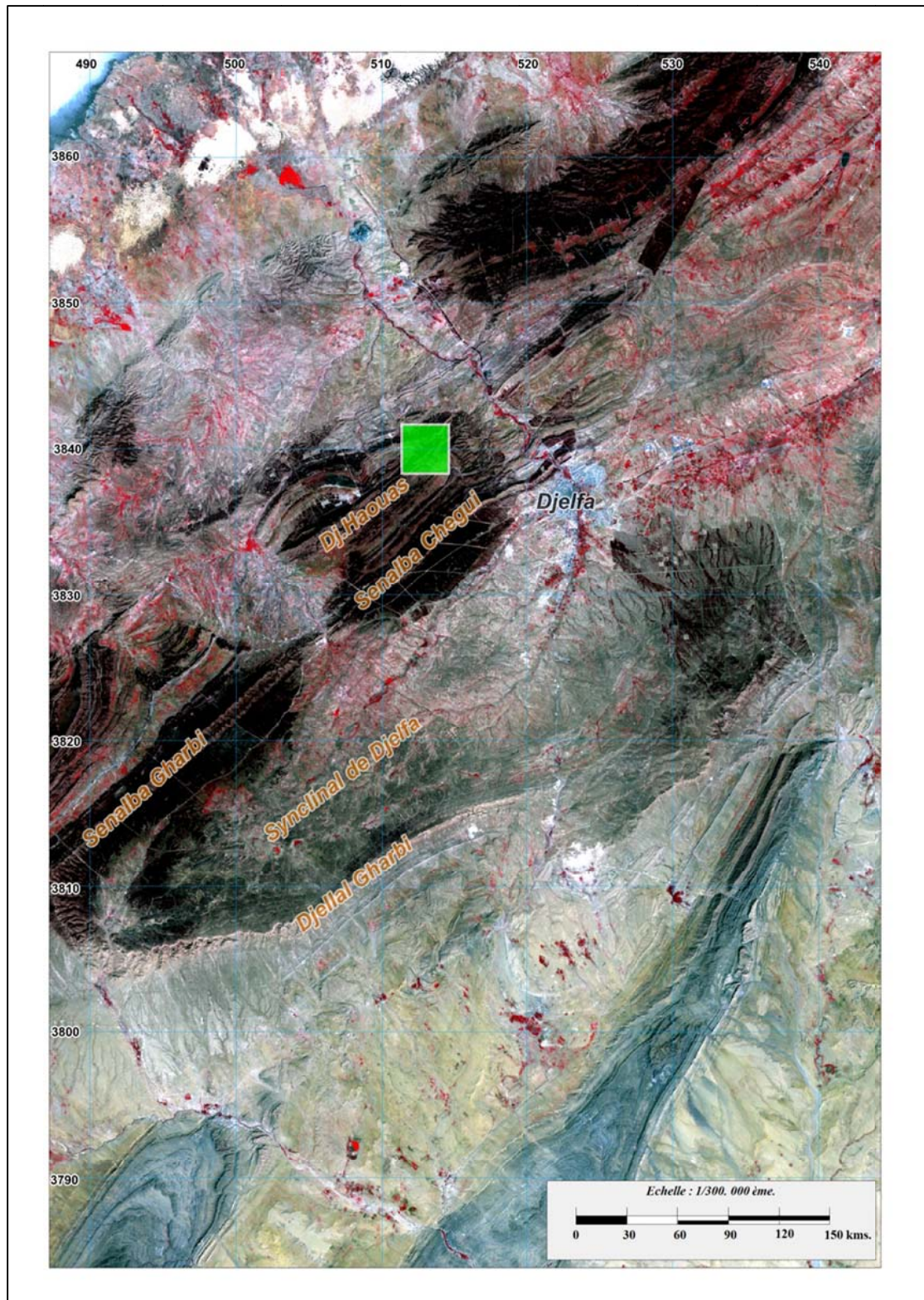


Figure 6 : Image satellitaire LANDSAT UTM 2007 montrant la situation géographique d'endroit d'échantillonnage de *Thymus fontanesii*

II.2.3. Évaporation rotative :

Les traces d'eau de la phase organique récupérée sont éliminées par le biais des sulfates de magnésium $MgSO_4$ déshydratés, cette opération est suivie d'une filtration afin de retenir les cristaux déshydratants.

La phase organique subit ensuite une évaporation rotative dont la température du bain marie est réglée à celle d'évaporation du solvant (35-36°C), l'huile essentielle est ainsi obtenue, après l'avoir pesée, elle est stockée à 4°C et à l'obscurité.

L'huile essentielle est diluée dans le méthanol (1%, v/v) avant de procéder aux analyses de GC/MS.

II.3. Analyse Chromatographique :

La CG/SM est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard (série HP 6890) couplé avec un spectromètre de masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70 eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5 MS (30 m x 0,25 mm), l'épaisseur du film est de 0,25 μm . La température de la colonne est programmée de 50 à 200 °C pendant cinq minutes à raison de 4 °C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5 ml/min.

Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/70, débit : 112 ml/min). L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98.

II.4. Micro-organismes étudiés :

Huit bactéries (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) et quatre champignons (*Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* sbs *verrucosum*, *Rhizopus stolonifer* et *Fusarium oxysporum*) ont fait l'objet de l'étude microbiologique.

Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24 heures à l'obscurité à 37 °C.

Les souches fongiques sont régulièrement entretenues par repiquage sur milieu Sabouraud au chloramphénicol.

II.5. Procédure microbiologique :

Avant la réalisation des tests bactériens, deux repiquages consécutifs sont effectués pour chaque souche, inoculée d'abord dans le BHIB liquide puis incubée pendant 24 h à 37°C °C. Un deuxième repiquage est effectué sur milieu solide (gélose nutritive) la veille de la réalisation du test antibactérien.

L'ensemble est ensuite incubé à 37°C pendant 18 h pour avoir des cellules bactériennes à leur phase exponentielle de croissance. À partir de cette culture fraîche, on prélève quelques colonies que l'on mélange avec de l'eau physiologique stérile. Pour la standardisation de la charge de l'inoculum de départ, la méthode de comparaison de la densité bactérienne à celle d'un tube de référence (0,5) Mc Farland dont la charge est supposée être 10^5 ufc/mL a été employée.

L'ensemencement se fait par stries à l'aide d'une anse de platine calibrée afin de prélever le même volume d'inoculum.

Quant aux champignons l'ensemencement se fait par dépôt de disques de culture fongique de 1 cm de diamètre prélevés à partir de la périphérie d'un tapis de biomasse et provenant d'une culture de sept jours. Leur incubation se fait à 25°C et s'étale encore sur sept jours.

II.5.1. Aromatogramme :

L'ensemencement de l'inoculum de 1 mL est réalisé en surface du milieu Mueller Hinton préalablement coulé dans des boîtes de Pétri. Après un quart d'heure, le surplus est éliminé dans la hotte à flux laminaire jusqu'à ce que la gélose soit sèche. Des disques stériles (6 mm de \varnothing) imprégnés d'une quantité d'huile essentielle. À l'état pur (5 μ l) sont déposés au centre des boîtes. Celles-ci sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 20 min puis incubées à

37°C pendant 24 h. Après incubation, l'absence de croissance bactérienne exprimant une activité antimicrobienne se traduit par un halo translucide autour du disque, de même couleur que la gélose stérile et dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (mesure exprimée en mm). Les huiles essentielles sont testées seules et en mélanges à raison de : 1/1, 1/2, 1/3 pour chacune.

Des témoins négatifs utilisant uniquement des disques placés sur gélose inoculée sans l'huile essentielle.

Des disques d'antibiotiques gentamicine et tétracycline ont été utilisés pour le contrôle de l'activité des souches tests. Ces produits servent de standard de référence (témoins positifs) pour l'évaluation de la sensibilité des microorganismes testés.

II.5.2. Micro-atmosphères :

Des disques stériles (6 mm de \emptyset) imbibés d'une quantité déterminée (5 μ l) d'huile essentielle sont déposés au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversées et incubées à 37 °C pendant 24 h pour les souches bactériennes et sept jour pour les souches fongiques. Après incubation, l'absence de la croissance se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins net, à tendance circulaire lorsque le disque est bien centré. Les résultats se lisent avec un pied à coulisse et s'expriment par un diamètre en mm.

Les boîtes contrôles sont des boîtes de Pétri ensemencées dans les mêmes conditions expérimentales.

II.5.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI :

Du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0.2 %, ⁷⁵ Elle permet d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des huiles essentielles et d'augmenter au maximum le contact germe/composé.

⁷⁵ Remmal A, Bouchikhi T, Rhayour K, et al. (1993), Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. J Ess Oils Res 2(5):179–84

Des dilutions sont préparées au $1/10^e$, $1/20^e$, $1/40^e$, $1/80^e$, $1/160^e$, $1/320^e$ et $1/640^e$, $1/1280^e$, $1/2560^e$, $1/5120^e$ et $1/10240^e$ dans cette solution d'agar. Dans des tubes à essai contenant chacun 13,5 ml du milieu solide TSA (*tryptic soja agar*) pour les bactéries, le PDA pour les moisissures, stérilisés à l'autoclave pendant 30 minutes à 120 °C et refroidis à 45 °C, on ajoute aseptiquement 1,5 ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales de $1/100$, $1/200$, $1/400$, $1/800$, $1/1600$, $1/3200$, $1/6400$, $1/12800$, $1/25600$, $1/51200$, $1/51200$ et $1/102400$.

On agite convenablement les tubes afin de bien disperser l'huile essentielle dans le milieu de culture avant de les verser dans les boîtes de Pétri. Des témoins, contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2 % seule, sont également préparés.

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en huile essentielle. où l'on n'observe aucune croissance bactérienne.

II.5.4. Détermination des concentrations minimales bactéricides CMB et fongicides CMF :

La nature de l'activité de chacune des huiles essentielles testées a été déterminée par la méthode de PIBIRI (2006). À partir des aromatogrammes de 48 h, les zones translucides entourant les disques ont été repiquées à l'aide d'une anse stérile dans des tubes à essai contenant le milieu B.H.I.B. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h.

Un deuxième repiquage à l'aide d'une anse stérile est effectué sur gélose nutritive (ensemencement par stries) à partir des tubes à B.H.I.B. après 24 h d'incubation.

Au bout de 24 h d'incubation à 37°C, l'absence ou présence de colonies est observée. L'absence de développement bactérien indique un effet bactéricide de l'huile essentielle en question, tandis que la présence de colonies bactériennes nous renseigne sur un effet bactériostatique.

La même technique s'applique pour la détermination des concentrations minimales fongicides CMF.



Chapitre III
RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Rendement :

Le rendement en huile essentielle de *Thymus fontanesii* était de 2.611 %, légèrement plus important que celui obtenu dans l'étude de Haddouchi.F. *et al* (2.%)⁷⁶, et inférieur à celui obtenu dans l'étude de Mebarki N. (3.14%).⁷⁷

Le rendement en huile essentielle de *Zyziphora hispanica* était de 4.238%.

III.2. Composition chimique :

III.2.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Les composés de *Thymus fontanesii* identifiés sont alignés dans le tableau 1.

L'analyse chromatographique a permis d'identifier sept composés dont celui majoritaire était le thymol à 57.38 %, même produit majoritaire identifié par Mebarki N. (44%), plusieurs espèces du genre thymus, entre autre : *Thymus vulgaris*, *Thymus numidicus*, *Thymus ciliates*, *Thymus daenensis subsp daenensis*, *Thymus kotschyanus* semblent avoir également le thymol comme produit majoritaire^{78,79,80}

⁷⁶ Haddouchi.F *et al*, Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle, de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut, Afrique SCIENCE 05(2) (2009) p246 – 259.

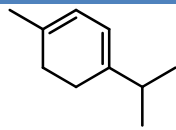
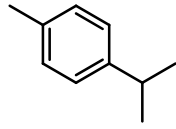
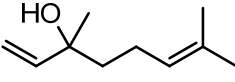
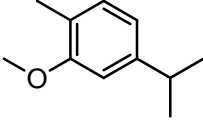
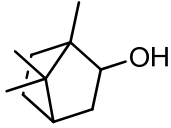
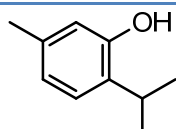
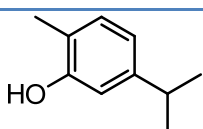
⁷⁷ Mebarki N., mémoire de magister, université de Boumerdès 2010.

⁷⁸ Agnieszka N., The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere, *Food Microbiology*,2012.

⁷⁹ Rota M., Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils, *Food Control* 19 (2008) p681–687

⁸⁰ Nickavar B *et al*, *Analysis of the essential oils of two Thymus species from Iran*, *Food Chemistry* 90 (2005) 609–611

Tableau III.1: Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* gratifiée par GC/MS

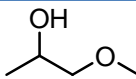
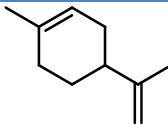
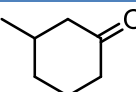
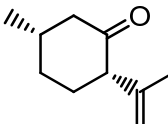
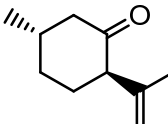
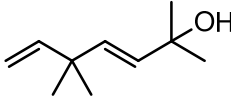
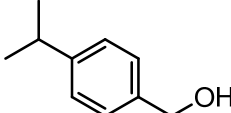
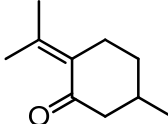
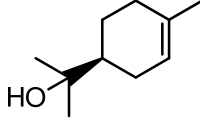
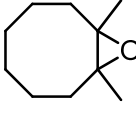
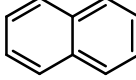
Composé	Formule développée	Pourcentage %
γ -terpinene		6.535
p-cymene		8.411
Linalool		6.396
carvacrol methyl ether		10.841
1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol		4.737
Thymol		57.378
Carvacrol		5.702

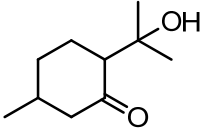
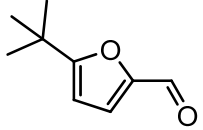
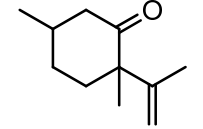
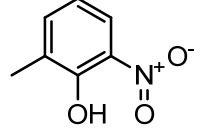
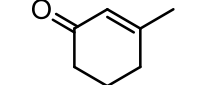
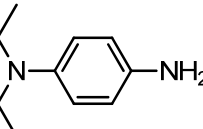
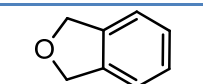

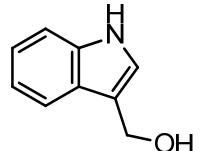
Outre le thymol, le carvacrol methyl ether, le p-cymene, l' γ -terpinene, le linalool, le carvacrol et le 1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol sont aussi présents.

III.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica*

Les composés de *Zyziphora hispanica* identifiés sont alignés dans le tableau 2.

Tableau III.2 Composition chimique de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* gratifiée par GC/MS

Composé	Formule développée	Pourcentage %
1-methoxy-2-propanol		0.22
Limonene		0.20
methyl-3-cyclohexanone		0.32
cis-isopulegone		1.34
trans-isopulegone		1.54
2,5,5-trimethyl-3,6-heptadien-2-ol		0.59
(4-isopropylphenyl)methanol		0.40
Pulegone		75.23
α -terpeniol		0.54
1,8-dimethyl-9-oxabicyclo[6.1.0]nonane		0.64
Naphthalene		0.11

1(RS)-8-hydroxy-p-menth-3-one		0.79
5-(<i>tert</i> -butyl)furan-2-carbaldehyde		0.65
2,5-dimethyl-2-(prop-1-en-2-yl)cyclohexanone		0.44
2-methyl-6-nitrophenol		0.73
2-cyclohexen-1-one,3-methyl		2.64
N,N-diethyl 1,4 benenediamine		0.12
1,3-dihydroisobenzofuran		0.36
9-octadecenoic acid		0.52
ethanol-3-indole		6.28

L'analyse chromatographique a permis d'identifier seize composés, celui majoritaire était la pulégone à 75.23 %, même produit majoritaire identifié dans *Z. pamiralaica*, *Z. denticulata*, *Z. Tenuior*⁸¹, *Z. bungeana*, *Z. clinopodioides*⁸², *Z. vychodceviana*, *Z. pedicelcata*, *Z. persica*⁸³, *Z. tenuior*⁸⁴ et *Z. clinopodioides subsp. rigida (Boiss.)*⁸⁵.

Cis et trans isopulegone étaient également identifiés et avaient respectivement les pourcentages suivants : 1.54 % et 1.34 %.

Le limonène était un produit minoritaire alors qu'il est majoritaire chez *Z. persica*⁹, *Z. taurica subsp. Cleonioides*⁸.

III.3. Activités antimicrobiennes des huiles essentielles :

III.3.1. Aromatogrammes :

Dans le tableau III.3 sont consignés les résultats expérimentaux des aromato-grammes évaluant l'activité antibactérienne de chacune des deux huiles essentielles ainsi que celles recomposées en mélanges aux proportions : 1/1, 1/2, 1/3. La gentamicine et la tétracycline servent de témoins positifs.

⁸¹ A. D. Dembitskii, E. Sh. Bergaliev, F. Yu. Kasumov, and M. I. Kyazimov, *Izv. Chemical composition of the essential oils of Ziziphora growing under various ecological conditions, chemistry of natural compounds volume 30*, 6, 673-675 (1994),

⁸² A. D. Dembitskii, E. Sh. Bergaliev, and G. I. Kalinkina, *Izv. Nats. Akad. Nauk Resp. Kaz., Ser. Khim.*, 4, 86, (1993)

⁸³ A. D. Dembitskii, E. Sh. Bergaliev, and M. I. Kyazimov, *Khim. Prir. Soedin.*, 6, 727 (1994)

⁸⁴ E. Sezik, G. Tumen, and K. H. C. Baser, *Flavour Fragr. J.*, 6, 101 (1991)

⁸⁵ P. Salehi, A. Sonboli, F. Eftekhari, S. Nejad-Ebrahimi, and M. Yousefzadi, *Biol. Pharm. Bull.*, 10, 1892 (2005)

Tableau III.3: Résultats de l'aromatogramme testant l'activité antibactérienne des huiles essentielles et de leurs mélanges, exprimés en mm

	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 25923	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>S. aureus</i> 43300	<i>S. aureus</i> 29213	<i>K. pneumoniae</i> 700603	<i>E. faecalis</i> 29212	<i>B. cereus</i> 11778
Zyziphora hispanica	15,88	12,1	0	11,35	13,02	77,03	16,6	56,13
Thymus Fantanesii	41,31	26,53	0	43,06	82,74	85,25	35,99	59,75
Z-T 1/1	46,13	37,84	0	35,99	39,14	16,8	28,38	17,86
Z-T ½	19,67	28,92	0	74,68	75,18	43,05	37,25	48,06
Z-T 1/3	67,25	52,71	0	79,21	75,25	45,43	44,03	54,77
T-Z ½	29,70	32,11	0	30,63	37,82	18,91	20,29	33,48
T-Z 1/3	27,04	28,04	0	42,82	28,12	21,84	18,59	27,38
Genta	21,96	25,91	22,26	26,38	18,93	21,46	0	34,32
Tetra	26,01	29,51	15,67	33,9	8,34	0	09,00	30,91

Escherichia coli ATCC 25922 a manifesté une sensibilité vis-à-vis des deux huiles et des mélanges, l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* était plus active que celle de *Zyziphora hispanica*.

Le mélange des deux huiles (*Zyziphora hispanica*/3**Thymus fontanesii*) avait la meilleure activité antimicrobienne contre *E. coli*, environ trois fois plus importante que celle des antibiotiques utilisés comme témoins positifs.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 a manifesté une sensibilité vis-à-vis des deux huiles et des mélanges, sa sensibilité était moyenne à l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica*.

Le mélange des deux huiles (*Zyziphora hispanica*/3**Thymus fontanesii*) avait la meilleure activité antimicrobienne avec un halo d'inhibition dont le diamètre était de 67 mm.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 n'a manifesté aucune sensibilité vis-à-vis des deux huiles essentielles ni vis-à-vis de leurs mélanges.

Staphylococcus aureus ATCC 43300 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ont également manifesté une sensibilité vis-à-vis des deux huiles et ont été extrêmement sensibles aux mélanges (*Zyziphora hispanica*/3**Thymus fontanesii*) et (*Zyziphora hispanica*/2**Thymus fontanesii*) dont le diamètre inhibition a dépassé 74 mm, leur sensibilité à l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* était moyenne.

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 a été extrêmement sensible envers les deux huiles, les mélanges (*Zyziphora hispanica*/3**Thymus fontanesii*) et (*Zyziphora hispanica*/2**Thymus fontanesii*) avaient une activité antimicrobienne moins importante que celle de chaque huile à part. Cette souche n'est pas sensible à la tétracycline.

Enterococcus faecalis ATCC 29212 a été très sensible à l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* et extrêmement sensible à celle de *Thymus fontanesii*, la plus forte activité antibactérienne constatée était celle du mélange (*Zyziphora hispanica* / 3 * *Thymus fontanesii*). Cette souche n'est pas sensible à la gentamycine.

Bacillus cereus ATCC 11778 a été extrêmement sensible aux deux huiles essentielles et aux mélanges sauf (*Zyziphora hispanica* / *Thymus fontanesii*) vis-à-vis duquel elle était très sensible.

Le tableau III.4 récapitule les résultats de l'aromatogramme testant l'activité antifongique des huiles essentielles et de leurs mélanges.

Tableau III.4: Résultats de l'aromatogramme testant l'activité antifongique des huiles essentielles et de leurs mélanges, exprimés en mm

	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Penicillium viridicatum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	Témoin
<i>Zyziphora hispanica</i>	35.14	28.08	0	0	0
<i>Thymus Fontanesii</i>	46.21	–	–	28.03	0
Z-T 1/1	–	–	–	–	0
Z-T 1/2	–	–	–	–	0
Z-T 1/3	–	–	–	–	0
T-Z ½	–	–	–	–	0
T-Z 1/3	–	–	–	–	0
(–) aucune croissance fongique (0) aucune activité antifongique					

Les résultats montrent que *Penicillium viridicatum* et *Aspergillus flavus* sont insensibles à l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* alors que *Fusarium oxysporum* et *Rhizopus stolonifer* sont extrêmement sensibles.

Toutes les souches fongiques testées sont extrêmement sensibles à l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, notamment *Rhizopus stolonifer* et *Penicillium viridicatum* dont aucun développement n'a été observé.

Aucun développement fongique ne s'est manifesté en présence des mélanges des huiles.

III.3.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI):

Dans le tableau III.5 sont alignés les résultats d'inhibition de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, à des concentrations comprises entre 1% et 0.001%, vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Tableau III.5: Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* vis-à-vis des souches bactériennes

	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 25923	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>S. aureus</i> 43300	<i>S. aureus</i> 29213	<i>K. pneumoniae</i> 700603	<i>E. faecalis</i> 29212	<i>B. cereus</i> 11778
1%	-	-	+	-	-	-	-	-
0.5%	-	-	+	-	-	-	-	-
0.250%	+	-	+	-	-	+	+	+
0.125%	+	+	+	+	-	+	+	+
0.062%	+	+	+	+	-	+	+	+
0.031%	+	+	+	+	+	+	+	+
0.015%	+	+	+	+	+	+	+	+
0.008%	+	+	+	+	+	+	+	+
0.003%	+	+	+	+	+	+	+	+
0.002%	+	+	+	+	+	+	+	+
0.001%	+	+	+	+	+	+	+	+
Témoin	+	+	+	+	+	+	+	+

Les résultats montrent que l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* est active sur toutes les souches bactériennes testées, sauf *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, avec les CMI suivantes :

Escherichia coli ATCC 25922 (0.5%), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.25%), *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (0.25) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (0.062%), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (0.5%), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (0.5%), *Bacillus cereus* ATCC 11778 (0.5%).

Les résultats d'inhibition de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica*, à des concentrations comprises entre 1% et 0.001%, vis-à-vis des souches bactériennes testées sont alignés dans le tableau III.6.

Tableau III.6 : Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* vis-à-vis des souches bactériennes

	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 25923	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>S. aureus</i> 43300	<i>S. aureus</i> 29213	<i>K. pneumoniae</i> 700603	<i>E. faecalis</i> 29212	<i>B. cereus</i> 11778
1%	-	-	+	-	-	-	-	-
0.5%	-	-	+	-	-	-	-	-
0.250%	+	-	+	+	-	+	+	+
0.125%	+	+	+	+	+	+	+	+
0.062%	+	+	+	+	+	+	+	+
0.031%	+	+	+	+	+	+	+	+
0.015%	+	+	+	+	+	+	+	+
0.008%	+	+	+	+	+	+	+	+
0.003%	+	+	+	+	+	+	+	+
0.002%	+	+	+	+	+	+	+	+
0.001%	+	+	+	+	+	+	+	+
Témoin	+	+	+	+	+	+	+	+

Les résultats montrent que l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* est active sur toutes les souches bactériennes testées, sauf *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, avec les CMI suivantes :

Escherichia coli ATCC 25922 (0.5%), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.25%), *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (0.5%) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (0.25%), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 7006033 (0.5%), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (0.5%), *Bacillus cereus* ATCC 11778 (0.5%).

Les CMI de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* sont plus faibles pour *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et se valent pour le reste des souches testées.

Le tableau III.7 illustre les résultats de la recherche des concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, contre les souches fongiques testées.

Tableau III.7: Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* vis-à-vis des souches fongiques

	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Penicillium viridicatum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
1%	–	–	–	–
0.5%	–	–	–	–
0.25%	–	–	–	–
0.125%	–	–	–	+
0.062%	–	–	–	+
0.031%	–	+	–	+
0.015%	–	+	–	+

Les résultats montrent que l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* est active sur toutes les souches fongiques, avec pour CMI:

Penicillium viridicatum (0.015%) *Aspergillus flavus* (0.25%) *Fusarium oxysporum* (0.015%) *Rhizopus stolonifer* (0.062%).

Les résultats de la recherche des concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica*, contre les souches bactériennes testées sont alignés dans le tableau III.8.

L'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* est active sur toutes les souches fongiques sauf *Aspergillus flavus*, avec pour CMI:

Penicillium viridicatum (0.125%) , *Fusarium oxysporum* (0.125%) *Rhizopus stolonifer* (0.25%).

Les CMI de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* sont plus faibles que celles de *Zyziphora hispanica*.

Tableau III.8: Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* vis-à-vis des souches fongiques

	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Penicillium viridicatum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
1%	–	–	–	+
0.5%	–	–	–	+
0.25%	–	–	–	+
0.125%	–	+	–	+
0.062%	+	+	+	+
0.031%	+	+	+	+
0.015%	+	+	+	+

III.3.3. Concentrations minimales bactéricides (CMB) :

Les résultats de la recherche des concentrations minimales bactéricides de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, contre les souches bactériennes testées sont alignés dans le tableau III.9.

L'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* contre *Bacillus cereus* ATCC 11778 était bactériostatique. Aucune activité bactéricide n'a pu être révélée.

La CMB la plus faible a été observée chez *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (0.125%), la plus élevée chez *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (1%).

Tableau III.9: concentrations minimales bactéricides de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* contre les souches bactériennes

	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 25923	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>S. aureus</i> 43300	<i>S. aureus</i> 29213	<i>K. pneumoniae</i> 700603	<i>E. faecalis</i> 29212	<i>B. cereus</i> 11778
1%	-	-	+	-	-	-	-	+
0.5%	-	-	+	-	-	-	+	+
0.250%	+	+	+	+	-	+	+	+
0.125%	+	+	+	+	-	+	+	+
0.062%	+	+	+	+	+	+	+	+

Le tableau III.10 illustre les résultats de la recherche des concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica*, contre les souches bactériennes testées.

Tableau III.10: concentrations minimales bactéricides de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* contre les souches bactériennes

	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 25923	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>S. aureus</i> 43300	<i>S. aureus</i> 29213	<i>K. pneumoniae</i> 700603	<i>E. faecalis</i> 29212	<i>B. cereus</i> 11778
1%	-	-	+	-	-	-	-	+
0.5%	-	+	+	+	+	+	+	+
0.250%	+	+	+	+	+	+	+	+

L'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* contre *Bacillus cereus* ATCC 11778 était également bactériostatique. Aucune activité bactéricide n'a pu être révélée.

La CMB la plus faible a été observée chez *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.125%), la plus élevée (1%) chez *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Les résultats de la recherche des concentrations minimales fongicides de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, contre les souches fongiques testées sont alignés dans le tableau III.11

Tableau 11: Concentrations minimales fongicides de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* contre les souches fongiques CMF

	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Penicillium viridicatum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
1%	-	-	-	-
0.5%	-	-	-	-
0.25%	-	-	-	+
0.125%	-	+	+	+
0.062%	+	+	+	+
0.031%	+	+	+	+
0.015%	+	+	+	+

Les résultats montrent que l'huile essentielle de s est dotée d'une action fongicide dont la concentration minimale la plus faible a été obtenue avec *Penicillium viridicatum* (0.25%) et celle la plus forte a été obtenue avec *Aspergillus flavus* (0.5%).

Les résultats de la recherche des concentrations minimales fongicides de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, contre les souches fongiques testées sont alignés dans le tableau III.12.

Tableau 12 Concentrations minimales fongicides de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* contre les souches fongiques

	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Penicillium viridicatum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
1%	-	-	+	-
0.5%	-	-	+	+
0.25%	+	+	+	+
0.125%	+	+	+	+
0.062%	+	+	+	+
0.031%	+	+	+	+
0.015%	+	+	+	+

Les résultats montrent que l'activité antifongique que possède l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* contre *Penicillium viridicatum* est fongistatique et qu'elle n'est pas fongicide, elle possède par contre des activités fongicides vis-à-vis du reste des souches fongiques testées, les CMB

de *Fusarium oxysporum* et de *Rhizopus stolonifer* sont égales à 0.5 %, quant à *Aspergillus flavus* la CMB est égale à 1 %.

III.3.4. Micro-atmosphères :

Les tableaux III.13 et III.14 illustrent les résultats du test des micro-atmosphères sur les souches bactériennes testées pour les deux huiles respectives de *Thymus fontanesii* et *Zyziphora hispanica*.

Tableau III.13: Résultats du test des micro-atmosphères, évaluant l'activité antibactérienne des composés volatils de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* contre les souches bactériennes testées, exprimés en mm

	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 25923	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>S. aureus</i> 43300	<i>S. aureus</i> 29213	<i>K. pneumoniae</i> 700603	<i>E. faecalis</i> 29212	<i>B. cereus</i> 11778
Diamètre d'inhibition	0	12.60	0	28.34	26.11	0	16.08	31.36

Les résultats montrent que *Bacillus cereus* ATCC 11778 est particulièrement sensible aux composés volatils de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* avec un diamètre d'inhibition égal à 31.36 mm suivie par *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *S. aureus* 2921, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; alors que *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 n'ont manifesté aucune sensibilité.

Tableau III.14: Résultats du test des micro-atmosphères, évaluant l'activité antibactérienne des composés volatils de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* contre les souches bactériennes testées, exprimés en mm

	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 25923	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>S. aureus</i> 43300	<i>S. aureus</i> 29213	<i>K. pneumoniae</i> 700603	<i>E. faecalis</i> 29212	<i>B. cereus</i> 11778
Diamètre d'inhibition	0	0	0	0	0	0	0	37.55

Les tableaux III.15 et III.16 illustrent les résultats du test des micro-atmosphères sur les souches fongiques testées pour les deux huiles respectives de *Thymus fontanesii* et *Zyziphora hispanica*.

Tableau III.15: Résultats du test des micro-atmosphères, évaluant l'activité antifongique des composéé volatils de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* contre les souches fongiques testées, exprimés en mm

	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Penicillium viridicatum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	témoin
Diamètre d'inhibition	38.69	27.95	21.60	0	0

On constate que la seule souche n'ayant manifesté aucune sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* est *Aspergillus flavus*, toutes les autres souches se sont montrées très sensibles.

Tableau III.16: Résultats du test des micro-atmosphères, évaluant l'activité antifongique des composéé volatils de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* contre les souches fongiques testées, exprimés en mm

	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Penicillium viridicatum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	témoin
Diamètre d'inhibition	0	0	0	0	0

Les résultats ne montrent aucune sensibilité des souches fongique vis-à-vis des composés volatils de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica*.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* pourrait être due à son composé majoritaire la pulégone, composé dont l'activité bactéricide a été prouvée par plusieurs études^{86,87}, comme elle pourrait être due à l'action synergétique de son composé majoritaire avec les autres composés qui la constituent.⁸⁸

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* pourrait être due à la présence de composés hautement bactéricides notamment le thymol, le p-cymen et l' γ -terpinene. Ceci a été prouvé par plusieurs études.^{89,90} Cette activité pourrait tout de même être due à l'action synergétique tous ses composés.⁹¹

La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* lors de tous les tests effectués peut s'expliquer par le fait que sa membrane cellulaire possède des mécanismes complexes et efficaces qui parviennent à empêcher la pénétration des constituants de l'huile essentielle.⁹²

⁸⁶ Flamini, G., Cion, P.L., Puleio, R., Morelli, I., Panizzi, L., 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytotherapy Research* 13, 349–351

⁸⁷ Marinkovi, B., Marin, P.D., Knevi-Vukevi, J., Sokovi, M.D., Brki, D., 2002. Activity of essential oils of three *Micromeria* species (Lamiaceae) against micromycetes and fungi. *Phytotherapy Research* 16, 336–339

⁸⁸ Baser, K.H.C., 2002. Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure Applied Chemistry* 4, 527–545

⁸⁹ Hazzit, M., Baaliouamer, A., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., 2006. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, 6314–6321

⁹⁰ Hazzit, M., Baaliouamer, A., Verissimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry* 116, 714–721

⁹¹ Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A., 2002. Evaluation of antifungal action of cilantro oil vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73, 83–92

⁹² Mann, C.M., Cox, S.D., Markham, J.L., 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology* 30, 294–297



CONCLUSION GÉNÉRALE

Cosnclusion générale

La flore steppique est riche en plantes aromatiques et médicinales et bon nombre d'entre elles peuvent être valorisées en tant que sources de produits lucratifs. Ces derniers obtenus par hydrodistillation du matériel végétal, trouvent des usages dans divers secteurs (parfumerie, cosmétique, aromathérapie...). Ils peuvent alors constituer un créneau d'activités contribuant à un développement économique durable pour la steppe.

Ces huiles essentielles se présentent généralement sous forme de mélanges complexes ayant diverses vertus, notamment leurs pouvoirs antimicrobiens. Il est nécessaire de connaître leurs compositions et activités biologiques lorsqu'on souhaite les contrôler, commercialiser, ou mettre en évidence leurs éventuelles spécificités.

Les différentes manipulations réalisées au cours de ce travail, ont permis de caractériser les compositions chimiques des huiles essentielles de *Zyziphora hispanica* et de *Thymus fontanesii*, poussant à l'état spontané dans la région de la steppe du sud- algérois, et de montrer leurs propriétés antibactériennes à l'égard de huit souches bactériennes et de quatre souches fongiques.

Rendement :

Le rendement d'extraction est de 4,238% chez *Zyziphora hispanica* et de 2.611 % chez *Thymus fontanesii*.

Composition chimique :

L'analyse par GC/MS a montré que l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* contient 20 composés avec la pulégone (75.23%) comme produit majoritaire, et que celle de *Thymus fontanesii* contient 7 composés avec le thymol à 57.38 %, le p-cymène (8.455%), l' γ -terpinène (6.535 %), le linalool (6.396 %) et le carvacrol (5.782 %).

L'étude microbiologique :

- L'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Elle s'est révélée douée d'une activité antibactérienne contre toutes les bactéries testées sauf *Pseudomonas aeruginosa*. Cette activité est d'une part **bactéricide** contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus aureus, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus cereus*, et d'autre part **bactériostatique** contre *Bacillus cereus*.

Elle a montré par ailleurs une forte action fongicide sur toutes les souches fongiques testées.

L'évaluation de son pouvoir antimicrobien par la technique des microatmosphères montre que les substances volatiles générées, agissent significativement contre la prolifération bactérienne dans le cas de *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *Staphylococcus aureus* ATTC 43300, *Staphylococcus aureus* ATTC 29213, *Enterococcus faecalis* ATTC 29212 et *Bacillus cereus* ATTC 11778 et contre la prolifération fongique dans le cas de tous les champignons sauf *Aspergillus flavus* relativement moins sensible.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* est nettement plus importante que celle des deux antibiotiques utilisés comme référence : la gentamycine et la tétracycline.

- l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica*

Quant à elle, a donné des résultats montrant qu'elle est douée d'activité antibactérienne contre toutes les bactéries testées sauf *Pseudomonas aeruginosa*. Cette activité s'avère bactéricide contre toutes les bactéries testées sauf *Bacillus cereus*, qui a subi une inhibition bactériostatique.

Cette huile essentielle a également une capacité fongicide contre toutes les souches fongique testées sauf *Penicillium viridicatum*.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien par la technique des microatmosphères montre que les substances volatiles générées, agissent significativement contre la prolifération bactérienne de *Bacillus cereus*.

Les substances volatiles n'ont par contre, aucune activité antifongique.

- Mélange des 2 huiles essentielles

Les huiles essentielles ci-dessus étudiées, recomposées en mélanges à différentes proportions ont une activité antimicrobienne importante sur toutes les bactéries et les champignons testés sauf sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Epilogue :

Jusque-là dans notre pays, les études menées pour l'extraction des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et de *Zyziphora hispanica L* se sont limitées à une ou deux tentatives de laboratoire sans lendemain, alors que le territoire notamment steppique recèle une biomasse végétale considérable et exploitable sur le plan industriel.

Les huiles essentielles, extraites de ces plantes ont des profils chromatographiques révélateurs de vertus appréciées en aromathérapie et demandées en parfumerie.

Leurs propriétés antimicrobiennes remarquables peuvent être exploitées, de manière sûre et utile, dans le domaine agro-alimentaire.

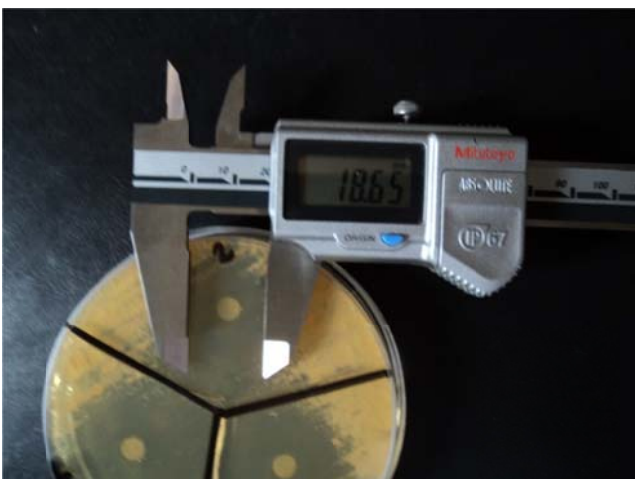
En outre, leurs potentialités thérapeutiques encore inconnues, peuvent ouvrir de très intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir.

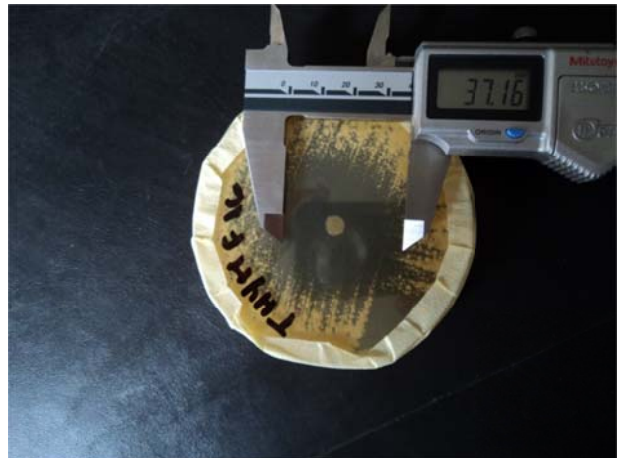
Finalement, l'objectif premier de cette étude a été atteint puisque le travail a contribué à caractériser et à évaluer les pouvoirs à usages divers de ces huiles essentielles.

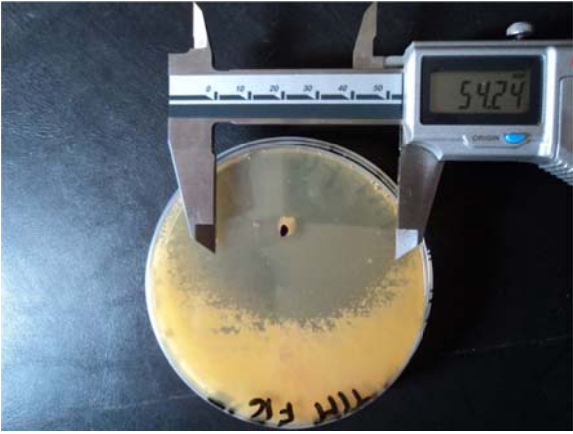
Ceci amène à penser qu'il y a de nouvelles alternatives basées sur une meilleure utilisation de la biodiversité végétale. Ces créneaux ouvrent la voie à la transformation et à la promotion de produits issus de biotechnologies simples et accessibles.

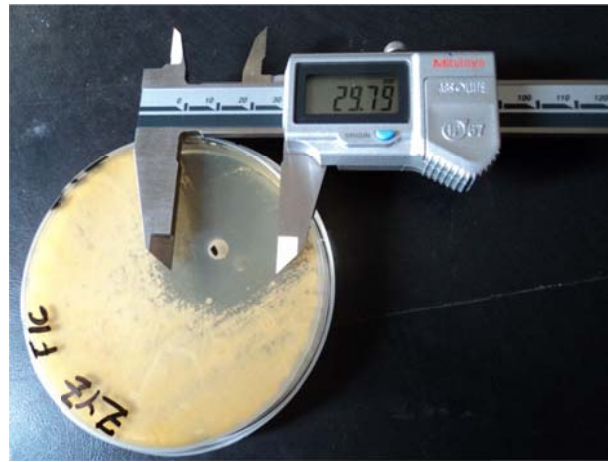
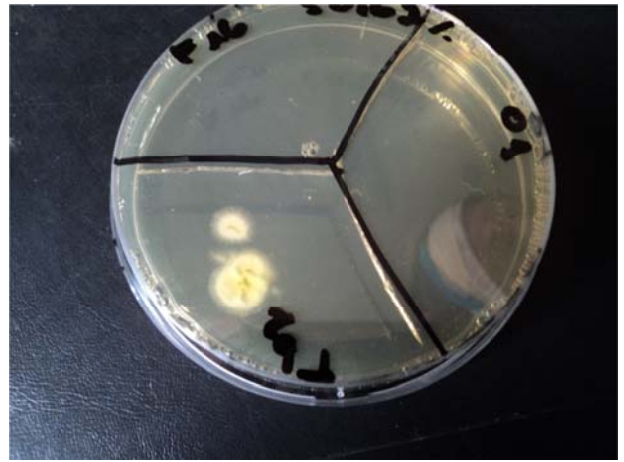
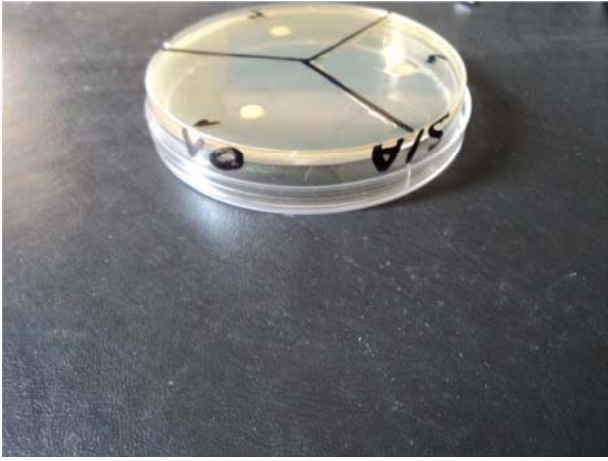
Annexe : Photos des différents résultats de l'analyse microbiologique.

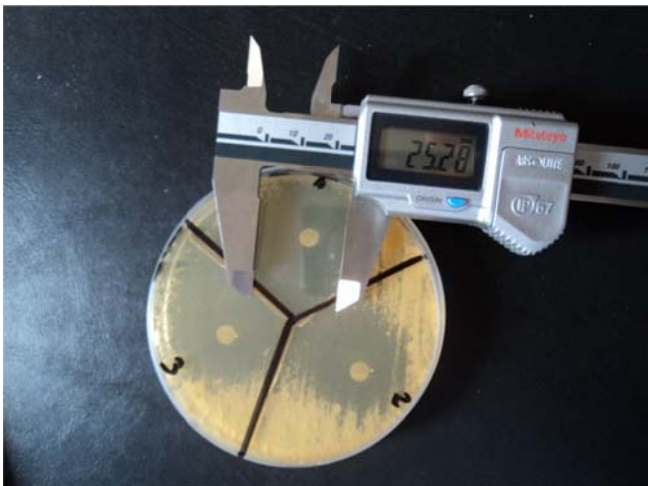
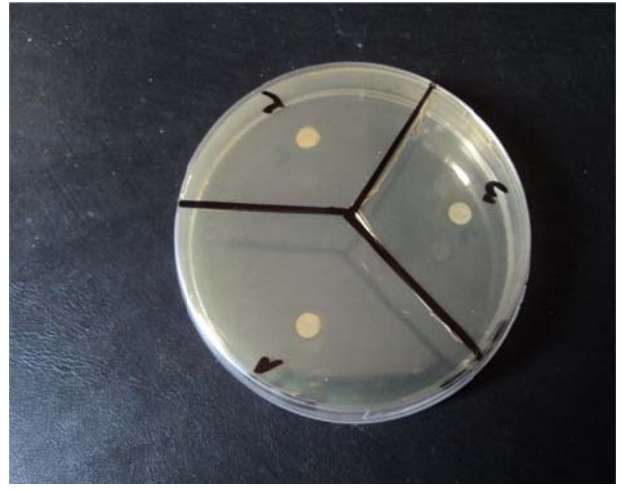












Références bibliographiques

- [1]. Garnero J, 2002, Huiles essentielles, Techniques de l'Ingénieur, K 345-1 : 1.
- [2]. Hart K.J., Yáñez-Ruiz D.R., Duval S.M., McEwan N.R., Newbold C.J., 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 147 : 8–35
- [3]. Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94 : 223–253
- [4]. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chemical Toxicology*. 46 : 446–475
- [5]. Dorman H.J.D., Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88 : 308–316
- [6]. Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J., 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*. 135 : 1893–1902
- [7]. Delaquis R.J., Stanich K., Girard B., Massa G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 74 : 101–109
- [8]. Karray-Bouraoui N., Rabhi M., Neffati M., Baldan B., Ranieri A., Marzouk B. et al., 2009. Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. *Industrial Crops and Products*. 30 : 338–343
- [9]. Combrinck S., Du Plooy G.W., Mccrindle R.I., Botha B.M., 2007. Morphology and Histochemistry of the Glandular Trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of botany*. 99 (6) : 1111–1119
- [10]. Rai M. K. , Acharya D. et Wadegaonkar P. (2003) Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants, In: *Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects*, Haworth press, N-York, London, Oxford. 165-1 85.
- [11]. Porter N. (2001) Essential oils and their production. *Crop & Food research*. Number 39.
- [12]. Belaïche P., (1979) traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1. L'aromathérapie. Ed. Maloine S.A. Paris.
- [13]. Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46 : 1914–1920.

- [14].Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K., Nychas G.J.E., 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on Escherichia coli O157:H7. Italian Journal of Food Science. 13 (1) : 65–75.
- [15].Sikkema J., Bont J.A.M., Poolman B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. Journal of Biological Chemistry. 269 : 8022–8028
- [16].Ultee A., Kets E.P., Smid E.J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology. 65: 4606–4610
- [17].Cox S.D., Mann C.M., Markam J.L., 2001. Interaction between components of the essential oil of Melaleuca alternifolia. Journal of Applied Microbiology. 91 : 492–497
- [18].Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.L., 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. Flavour Fragrance Journal. 14 : 322–332
- [19].Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology. 68 : 1561–1568
- [20].Gustafson R.H., Bowen R.E., 1997. Antibiotic use in animal agriculture. Journal of Applied Microbiology. 83 : 531–541
- [21].Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A., 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science. 90 : 2580–2595
- [22].Dumas, M.J., 1833. Ueber die vegetabilischen Substanzen welche sich dem Kampfer nähern, und über einige ätherischen Öle. *Ann. Pharmacie*, 6: 245–258.
- [23].Berthelot, M. 1859. Ueber Camphenverbindungen. *Liebigs Ann. Chem.*, 110: 367–368.
- [24].Wallach, O. 1914. *Terpene und Campher*, 2nd ed., Leipzig: Veit & Co.
- [25].*Nobel Lectures, Chemistry 1901-1921*. 1966, Elsevier Publishing Company, Amsterdam. 1966 :178-194.
- [26].von Baeyer, A. and O. Seuffert, 1901. Erschöpfende Bromierung des Menthons. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 34:40–53.
- [27].Ruzicka, L. 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9: 357–396.
- [28].Treibs, W. 1952. Über bi- und polycyclische Azulene. XIII. Das bicyclische Caryophyllen als Azulenbildner. *Liebigs Ann. Chem.*, 576: 125–131.
- [29].Šorm, F., L. Dolejš, and J. Pliva, 1950. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, 3: 187.
- [30].Barton, D.H.R. and A.S. Lindsay, 1951. Sesquiterpenoids. Part I. Evidence for a nine-membered ring in caryophyllene. *J. Chem. Soc. [London]*, 1951: 2988–2991.

- [31].Woodward, R.B. 1941. Structure and the absorption spectra of α , β -unsaturated ketones. *J. Am.Chem. Soc.*, 63: 1123–1126.
- [32].*Nobel Lectures, Chemistry 1963-1970*. 1972 Elsevier Publishing Company, Amsterdam. 1972 : 100-121.
- [33].Amlan K., Patra J.S., 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 71 : 1198–1222
- [34].Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A., 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90 : 2580–2595
- [35].Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A. et al., 2008. Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*. 145 : 209–228
- [36].Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwan R.S., 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. 34 : 3–21
- [37].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
- [38].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
- [39].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
- [40].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
- [41].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
- [42].de Billerbeck V-G- Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques – *Phytothérapie*;Vol. 5; pp 249–253. 2007
- [43].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
- [44].Ouraini 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 saturojeoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques – *Phytothérapie*; Vol.1; pp 6–14. 2007

- [45].Prabuseeninivasan 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
- [46].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
- [47].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
- [48].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
- [49].Jukič M.et Miloš M- Catalytic axidation and antioxidant propertic of thyme essential oils (Thymus vulgarae L.)- Croatica Chemica Acta ; Vol. 78; N°1; pp 105-110.2005
- [50].Inouye S, Abe S - Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse- Phytothérapie;Vol. 1; pp 2-4. 2007
- [51].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
- [52].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
- [53].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
- [54].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
- [55].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
- [56].Feng W et Zheng X - Essential oils to control Alternaria alternaria in vitro and in vivo- Food Control; Vol. 18; pp 1126-1130.2007
- [57].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
- [58].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

- [59].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
- [60].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
- [61].Lahlou M-Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils- Phytotherapy research; Vol.18; pp 435-448. 2004
- [62].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
- [63].Haddaf Y, Kaloustian J, Giordan R, Regli 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- 6e symposium international d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales ; Grasse, France. 2004
- [64].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
- [65].Bnmeton J, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, monoterpènes et sesquiterpènes; TEC & DOC, 3eme édition, pp 484-497. Lavoisier. Paris. 1999
- [66].HEMWIMON S., PAVASANT P. & SHOTIPRUX A. (2007).Microwar-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of Morinda Citrifolia.Separation and purification Technology, 54,44-50
- [67].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
- [68].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
- [69].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
- [70].Lahlou M-Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils- Phytotherapy research; Vol.18; pp 435-448. 2004
- [71].GUÉRIN-FAUBLÉE (V.) et CARRET (G.) : L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées nationales GTV-INRA, 1999, 5-12
- [72].Tagg J.R. et McGiven A.R. (1971). Assay system for bacteriocins. J. Appl. Microbiol. 21: 943
- [73].Robert.D., (1995), Méthodes de dilutions, In *Antibiotiques et antibiogrammes* : 131-137

- [74].PIBIRI M.C., (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctorat. Polytechniques Fédérale de Lausanne
- [75].Remmal A, Bouchikhi T, Rhayour K, et al. (1993), Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J Ess Oils Res* 2(5):179–84
- [76].Haddouchi.F *et al*, Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle, de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut, Afrique *SCIENCE* 05(2) (2009) p246 – 259.
- [77].Mebarki N., mémoire de magister, université de Boumerdès 2010.
- [78].Agnieszka N., The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere, *Food Microbiology*,2012.
- [79].Rota M., Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils, *Food Control* 19 (2008) p681–687
- [80].Nickavar B *et al*, *Analysis of the essential oils of two Thymus species from Iran, Food Chemistry* 90 (2005) 609–611
- [81].A. D. Dembitskii, E. Sh. Bergaliev, F. Yu. Kasumov, and M. I. Kyazimov, *Izv. Chemical composition of the essential oils of Ziziphora growing under various ecological conditions, chemistry of natural compounds volume* 30, 6, 673-675 (1994),
- [82].A. D. Dembitskii, E. Sh. Bergaliev, and G. I. Kalinkina, *Izv. Nats. Akad. Nauk Resp. Kaz., Ser. Khim.*, 4, 86, (1993)
- [83].A. D. Dembitskii, E. Sh. Bergaliev, and M. I. Kyazimov, *Khim. Prir. Soedin.*, 6, 727 (1994)
- [84].E. Sezik, G. Tumen, and K. H. C. Baser, *Flavour Fragr. J.*, 6, 101 (1991)
- [85].P. Salehi, A. Sonboli, F. Eftekhari, S. Nejad-Ebrahimi, and M. Yousefzadi, *Biol. Pharm. Bull.*, 10, 1892 (2005)
- [86].Flamini, G., Cion, P.L., Puleio, R., Morelli, I., Panizzi, L., 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamiantha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytotherapy Research* 13, 349–351
- [87].Marinkovi, B., Marin, P.D., Knevi-Vukevi, J., Sokovi, M.D., Brki, D., 2002. Activity of essential oils of three *Micromeria* species (Lamiaceae) against micromycetes and fungi. *Phytotherapy Research* 16, 336–339
- [88].Baser, K.H.C., 2002. Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure Applied Chemistry* 4, 527–545
- [89].Hazzit, M., Baaliouamer, A., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., 2006. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, 6314–6321

- [90].Hazzit, M., Baaliouamer, A., Verissimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. Food Chemistry 116, 714–721
- [91].Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A., 2002. Evaluation of antifungal action of cilantro oil vacuum packed ham. International Journal of Food Microbiology 73, 83–92
- [92].Mann, C.M., Cox, S.D., Markham, J.L., 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Letters in Applied Microbiology 30, 294–297

يهدف البحث لاستخلاص الزيوت الأساسية من نباتي السعتر *Thymus fontanesii* و النعناع البري *Zyziphora hispanica*، و تحديد التركيب الكيميائي و التوصيف الجزيئي لكل منهما، كما يهدف أيضا لتقييم التأثير المضاد للبكتيريا و الفطريات، و تقصي التراكيز الدنيا المثبطة، و كذا التراكيز الدنيا المبيدة، و تأثير المواد الطيارة لكلا الزيتين ضد ثمانية أنواع من البكتيريا و أربعة أنواع من الفطريات. أظهرت نتائج التحليل الكيميائي باستعمال تقنية الفصل الاستشرابي (الكروماتوغرافي) المقرون بمطيافية الكتلة، أن تركيب الزيت الأساسي ل *Thymus fontanesii* يضم سبعة مركبات حيث كان المركب الغالب thymol بنسبة 57.38% في حين يتكون الزيت الأساسي ل *Zyziphora hispanica* من عشرين مركبا، حيث كان pulegone هو المركب الغالب بنسبة 75.23%. كما تبين أن الزيتين اللذين تم اختبارهما، أظهرتا فعالية كبيرة في منع نمو طيف واسع من البكتيريا ما عدا *Pseudomonas aeruginosa* حيث أظهرت نتائج تقصي التراكيز الدنيا المثبطة و التراكيز الدنيا المبيدة أن فعالية كل من الزيتين أقوى من المضادات الحيوية المستعملة كشواهد. و بينت نتائج الدراسة قدرة المواد الطيارة للزيت الأساسي ل *Thymus fontanesii* على منع نمو البكتيريا و الفطريات على حد سواء غير أن المواد الطيارة للزيت الأساسي ل *Zyziphora hispanica* لم تظهر أية قدرة على منع نمو الفطريات رغم تأثيرها الملحوظ على نمو البكتيريا. كما أثبتت نتائج البحث تأثير خليط الزيتين (على اختلاف التراكيز) على نمو كل من البكتيريا و الفطريات.

الكلمات المفتاحية: النعناع البري، السعتر، الزيوت الطيارة، التأثير المضاد للمكروبات، التركيب الكيميائي.

ABSTRACT

The essential oils obtained from aerial part of *Zyziphora hispanica* and *Thymus fontanesii* in the south part of Algeria were evaluated for their chemical composition, antibacterial and antifungal activities against 8 Gram-positive and 4 fungal strains.

Essential oils were tested at concentrations from 0.001% to 1% to determine minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations (MIC and MBC).

GC/MS analyses revealed that *Thymus fontanesii* essential oil predominantly contains pulegone (75.23%). In *Zyziphora hispanica* essential oil, the main constituents were thymol (57.38 %), p-cymene (8.455 %) l'γ-terpinene (6.535 %), linalool (6.396 %) and carvacrol (5.782%).

The tested essential oils showed high antimicrobial activity against the micro-organisms used except *Pseudomonas aeruginosa*.

Thymus fontanesii essential oil was much more effective than *Zyziphora hispanica* essential oil. Both of them had a much greater activity on fungal strains than on bacterial strains.

Keywords: *Thymus fontanesii*, *Zyziphora hispanica*, GC/MS, essential oil, antimicrobial activity.

RÉSUMÉ :

La présente étude se propose de mettre en évidence la composition chimique et de faire ressortir les activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de *Zyziphora hispanica* et de *Thymus fontanesii* poussant à l'état spontané dans la steppe du sud algérois. L'analyse chromatographique par GC/MS a révélé la présence de 7 composés dans l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, avec le thymol comme produit majoritaire (57.38%) et de 20 composés dans l'huile essentielle de *Zyziphora hispanica* avec la pulégone (75.23%) comme produit majoritaire.

Les deux huiles essentielles se sont révélées douées d'une activité antimicrobienne très importante à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*.

La recherche des concentrations minimales inhibitrices CMI, bactéricides CMB et fongicides CMF a permis d'évaluer quantitativement le pouvoir antimicrobien des deux huiles essentielles, la plus faible CMI était celle de *Thymus fontanesii* contre *S. aureus* 29213 (0.062%).

L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* était beaucoup plus active que celle de *Zyziphora hispanica*, l'activité antifongique des deux huiles était plus importante que leur activité antimicrobienne.

Mots clés: *Thymus fontanesii*, *Zyziphora hispanica*, huile essentielle, GC/MS, activité antimicrobienne, activité antifongique.