**Université Ziane Achour de Djelfa**
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**
**Département de Biologie**

**MEMOIRE**

En vue de l'obtention du diplôme de master en Biologie

**Option :** Contrôle et Analyses des Denrées Alimentaires

**Thème**

# Evaluation «in vitro» du pouvoir antimicrobien des extraits de *Thymus capitatus (L.) Hoffmanns. & Link* et contribution à la détermination de leur composition chimique

**Présenté par:**

Benmessaoud Hossam Eddine

Gacem Sara

| | | |
|---|---|---|
| **Devant le jury composé de :** | Pr. Lahrech M. B. | **Président.** |
| | M. Kacimi M. | **Promoteur.** |
| | Dr. Benmadani S. | **Examinateur.** |
| | M. Mahi M. | **Examinateur.** |

**Année universitaire 2016-2017**

# *Dédicaces*

***Je dédie ce travail***

***A mes parents, frères et sœurs***

***A la mémoire de mes grands parents***

***Benmessaoud Hossam Eddine***

# *Dédicaces*

***Je Dédie ce travail à :***

***Mes chers parents Aissa et Ladmia***

***Mes sœurs et frère***

***Gacem Sara***

## *Remerciements :*

*Nous remercions d'abord le tout puissant Allah, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.*

*Nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance s'adressent à notre directeur de mémoire M.Mohamad Kacimi pour avoir suivi et dirigé ce travail, pour sa disponibilité, pour ses conseils et ses précieuses orientations qu'il n'a cessé de nous apporter tout au long de ce travail.*

*Nous adressons encore nos remerciements aux membres de jury :Pr. M. Lahrech, M. Dr. Benmadani S.et M. Mahi, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.*

**Table des matières**

**Introduction** ..... **12**

**Partie Bibliographique** ..... **3**

**1. Les plantes médicinales :** ..... **4**

1.1. Aperçu historique sur l'utilisation des plantes médicinales ..... 5

1.1.1. De la plante au médicament ..... 7

1.2. Les substances naturelles viennent du métabolisme secondaire ..... 9

1.2.1. Les métabolites secondaires : Une immense diversité de structures chimiques 11

1.2.1.1. Les composés phénoliques ..... 11

1.2.1.2. Quinones ..... 19

1.2.1.3. Les terpénoïdes et les stéroïdes ..... 19

1.2.1.4. Les alcaloïdes ..... 23

1.2.2. Les composés phénoliques et la santé de l'homme ..... 24

**2. Techniques conventionnelles d'extraction** ..... **26**

2.1. Distillation – Evaporation ..... 26

2.1.1. Codistillation avec vapeur d'eau ..... 27

2.1.2. Codistillation avec un fluide autre que l'eau ..... 28

2.1.3. Evaporation – concentration ..... 28

2.1.4. Rectification (fractionnement) ..... 29

2.1.5. Distillation sèche ..... 29

2.2. Extraction au moyen de solvants ..... 29

2.2.1. L'enfleurage à froid ..... 30

2.2.2. L'enfleurage à chaud ..... 30

2.3. Méthodes d'extraction à froid ..... 31

2.4. Méthode d'hydrodiffusion ..... 33

2.5. Extraction par des techniques innovantes ..... 34

2.5.1. Extraction par des solvants supercritiques ..... 34

2.5.2. Extraction par Détente Eclair (Flash–Détente) ..... 37

2.5.3. Détente Instantanée Contrôlée ..... 39

2.5.4. Extraction par ultrasons ..... 40

2.5.5. Extraction assistée par Micro-ondes ..... 42

2.5.5.1. Extraction par solvant assistée par micro-ondes ..... 43

2.5.5.2. Entraînement à l'air assisté par micro-ondes ..... 44
2.5.5.3. Hydrodistillation par micro-ondes sous pression réduite..... 44
2.5.6. Procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM) ..... 46

**3. Huiles essentielles comme agents antimicrobiens..... 47**
3.1. Généralités ..... 47
3.2. Mode d'action contre les bactéries..... 48

**4. Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne ..... 49**
4.1. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque) ..... 49
4.2. Technique en milieu liquide (méthode de dilution)..... 50
4.2.1. La dilution en bouillon ..... 50
4.2.2. La dilution en gélose..... 50
4.3. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM) ..... 50
4.4. Analyse par HPLC ..... 54
4.5. Détermination du taux d'humidité ..... 55
4.6. Rendement en huile essentielle $\boldsymbol{Rdt}$**HE**..... 55
4.7. Mesure de la densité selon la norme NF T 75-111 ..... 55
4.8. Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T 75-112..... 55
4.9. Mesure du pouvoir rotatoire : NF T 75-113..... 56
4.10. Analyse en Microscopie Electronique à Balayage..... 56

**5. Mesure de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles ..... 56**

**6. Généralité sur le plant..... 58**
6.1. Taxonomie ..... 58
6.2. Description de la Genre..... 58
6.3. *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link..... 59

**Partie Pratique..... 60**

**1. Matériels et produits : ..... 61**
1.1. Vererie..... 61
1.2. Produits chimiques..... 61
1.3. Appareils ..... 61
1.4. Autres ..... 62
1.5. Les souches ..... 62

**2. Procédé d'extraction : ..... 63**
2.1. Préparation de l'échantillon ..... 63
2.2. Hydrodistillation ..... 63
2.3. Extraction liquide-liquide ..... 64
2.4. Elimination du solvant ..... 65
**3. Etude de l'activité antibactérienne ..... 67**
3.1. Choix des milieux de culture ..... 67
3.2. Repiquage ..... 68
3.3. Préparation des suspensions ..... 68
3.4. Aromatogramme et Micro-atmosphère ..... 69
3.4.1. L'aromatogramme : ..... 69
3.4.2. La micro-atmosphère ..... 70
**4. Chromatographie en phase gazeuse (CG) et chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG/SM) ..... 71**
**Résultats et discussion ..... 72**
**1. Détermination de rendement d'huile essentielle ..... 73**
**2. Résultats de l'antibiogramme et la micro-atmosphère: ..... 74**
**3. Détermination de les compositions majoritaires du plant par Chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG/SM) ..... 78**
3.1. Bahrara ..... 78
3.2. Djebel Omran ..... 78
**Conclusion ..... 80**
**Références bibliographiques ..... 82**
**Annexe ..... 96**

## Liste des figures :

**Figure 1.** De la plante au médicament ……... 8
**Figure 2.** Relations biogénétiques entre les principales classes de métabolites secondaires, sources de principes actifs ……..... 10
**Figure 3.** Squelette moléculaire de base des flavonoïdes avec la numération classique ……..... 12
**Figure 4.** Voies de biosynthèse des flavonoïdes ……. 13
**Figure 5.** Structures chimiques de quelques phénols simples …… 14
**Figure 6**. Structures chimiques de quelques acides hydroxybenzoïque ……. 14
**Figure 7.** Structures chimiques de quelques acides hydroxycinnamiques ……. 15
**Figure 8.** Structures chimiques de quelques coumarines …… 16
**Figure 9.** Structure et numération des atomes de carbone du phénylpropane (1) et des lignanes (2) (liaison β-β' ou 8,8') ……...……. 16
**Figure 10.** Structures chimiques de quelques anthocyanidines …….. 17
**Figure 11.** Structures chimiques de quelques acides phénols ……. 18
**Figure 12.** Squelette moléculaire d'un flavan-3-ol ……. 18
**Figure 13.** Quelques motifs quinoniques …… 19
**Figure 14**. Voie de l'acide mévalonique et synthèse des terpénoïdes …… 20
**Figure 15**. Exemples de monoterpènes …….. 19
**Figure 16.** Quelques exemples de sesquiterpènes caractéristiques des huiles essentielles ……... 21
**Figure 17**. Filiation (schématique) des principaux groupes de lactones sesquiterpéniques ……. 21
**Figure 18.** Exemples de structures : (1) Taxane (diterpène) ; (2) Squalène (triterpène); (3) Cholesterol (stérols) ; (4) Cardénolides ……. 22
**Figure 19.** Exemples de quelques iridoïdes …… 23
**Figure 20**. Exemples de structures alcaloïdiques ……..... 24
**Figure. 21** Schéma des appareils d'Hydrodistillation (A), et d'entraînement à la vapeur d'eau B) ……... 28
**Figure. 22** Schéma des différents Sfumatrices …….. 32
**Figure. 23** Schéma représentatif de l'extraction par FMC in line ……. 33
**Figure. 24** Schéma du procédé d'hydrodiffusion ……... 34
**Figure. 25** Schéma de principe d'une extraction par CO2 supercritique …….. 35

**Figure. 26** Schéma de l'extraction par Flash Détente …… 38
**Figure. 27** Schéma d'une unité de Détente Instantanée Contrôlée (DIC) et son cycle de traitement ……... 40
**Figure. 28** Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore ……..... 41
**Figure. 29** Spectre électromagnétique …… 42
**Figure. 30** Schéma du procédé d'extraction MAPTM en continu (A) et photo d'une unité pilote du même procédé (B) ……. 44
**Figure.31** Schéma du procédé d'extraction par entrainement à l'air assisté par micro-ondes ……. 44
**Figure. 32** Schéma du procédé VMHD (A), Evolution des principaux paramètres (B), Photo d'une unité pilote du procédé VMHD (C) ……... 45
**Figure. 33** Schéma de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes …….. 46
**Figure. 34** Schéma du procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-ondevs (ESSAM) ……. 47
**Figure. 35** Aromatogramme sur boite de Pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle …… 57
**Figure. 36** *Thymus Capitatus (L.) Hoffmanns. & Link* …….……. 59
**Figure. 37** Pesée de la plante …….……..…….. 63
**Figure. 38** L'Hydrodistillation ……...…… 64
**Figure. 39** Séparation liquide-liquide ……...…….. 65
**Figure. 40** L'évaporateur rotatif ……. 66
**Figure. 41** Les huiles essentielles obtenues ……...……. 67
**Figure. 42** La mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre …… 69
**Figure. 43** L'application de disque sur le MH …….….. 70
**Figure. 44** L'application de disque sur couvercle de la boite de Pétri ……..… 70
**Figure. 45** La mesure des diamètres des halos d'inhibition ……..…. 97

## Liste des tableaux :

**Tableau 1 :** Quelques exemples de sources végétales riches en composés phénoliques connus pour leurs effets thérapeutiques …….. 25

**Tableau 2 :** Conditions opératoires des analyses par chromatographie en phase gazeuse …… 51

**Tableau 3 :** Conditions opératoires des analyses par CG/SM …….….. 52

**Tableau 4 :** Programmation des taux de solvants utilisés au cours de l'analyse par HPLC ……. 54

**Tableau 5** : Taxonomie de *Thymus Capitatus (L.) Hoffmanns. & Link* ….…….... 58

**Tableau 6** : Les rendements des huiles essentielles de *Thymus capitatus* de deux régions (Djebel Omran et Bahrara, Djelfa) ……... 73

**Tableau 7** : Les rendements de quelques espèces de *Thymus* …… 73

**Tableau 8 :** Les diamètres des halos d'inhibition (mm) des souches testées …….. 74

**Tableau 9 :** les diamètres des halos d'inhibition des souches testées de L'aromatogramme et la micro-atmosphère ……. 75

**Table 10** : l'activité antibactérienne de déférentes espèces de thymus ……..…... 77

**Table 11 :** Chemotypes des Huiles essentielles des espèces de thymus ……. 79

# Liste des abréviations :

**BSAC :** *British Society for Antimicrobial Chemotherapy*

**CG :** Chromatographie en phase gazeuse

**CG/SM :** Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

**$CO_2$ :** Dioxyde de carbone

**CPG :** Chromatographie en phase gazeuse.

**ESSAM :** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes

**GHz :** Giga Hertz

**HE :** Huile essentielle.

**INRA :** Institut National de la Recherche Agronomique.

**MH :** Mueller Hinton.

**R% :** Rendement en huile essentielle.

**UV :** Ultra-violet.

# Introduction

# Introduction

Depuis l'âge des temps de l'être humain est toujours en quête pour une meilleure vie et pour que celle-ci soit saine, il faut combattre les maladies pour ce fait 10000 antibiotique ont-été découverts afin de traiter tout type d'infection bactériennes or seulement une centaine d'antibiotique sont utilisé chez l'être humain. **(Lemarchand et Courvalin, 2008)**

La recherche scientifique sur les antibiotiques a vu son apogée durant les années 1940 et 1960 à partir de substances naturelles. Mais à partir des années 1980, les recherches se sont surtout focalisées sur des molécules de synthèse.

Les résultats ont dans l'ensemble été très décevants, permettant de découvrir très peu de nouveaux antibiotiques alors même que les phénomènes de résistance ne cessent d'augmenter, ces résistances à un ou plusieurs antibiotiques, auxquels la bactérie était auparavant sensible, peuvent survenir via une mutation génétique affectant le chromosome de la bactérie, ou par l'acquisition de matériel génétique (plasmide) porteur d'un ou plusieurs gènes de résistance, en provenance d'une autre bactérie **(Gutma, 2013).**

Le problème dû à la résistance des bactéries aux antibiotique aussi que le manque d'antibiotique efficaces sur les bactéries, nécessite des solutions immédiates afin de préserver la santé humaine.

La phytothérapie est une méthode ancestrale employée dans l'étude des plantes médicinales à la médecine. L'aromathérapie est une médecine douce qui utilise les plantes aromatiques sous forme d'essence, d'huile essentielle, d'hydrolat aromatique, ou d'huile végétale **(Gahbiche, 2009).**

C'est pourquoi, on s'est intéressé dans notre travail à l'étude d'une plante médicinale : *Thymus capitatus*, récoltée dans la région de Bahrara et Djebel Omran. Cette plante, très fréquente dans le bassin méditerranéen, est largement utilisée pour ses vertus médicinales.

Toutefois certaines ressources végétales particulières à notre pays 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.

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

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

Le présent mémoire se divise en deux parties, une partie bibliographique visant à identifier, définir, décrire la plante, les huiles essentielles, les méthodes d'extraction et analyse des huiles essentielles et d'autres données nécessaires.

La deuxième partie (pratique), s'intéressant à la description des étapes réalisées au laboratoire ainsi qu'au terrain (récolte de la plante), les résultats trouvés et leurs discussions, comparaison avec des travaux réalisés sur le même genre de plante.

# Partie

# Bibliographique

## 1. Les plantes médicinales :

Pourquoi se soigner par les plantes ? Intuitivement nous sommes tous capables de répondre à cette question. Parce que se soigner par les plantes, c'est se soigner de manière naturelle, en respectant son corps et surtout son cerveau ; parce que cela est plus doux et plus profond à la fois.

La phytothérapie, du grec Phyto et Therapeia, est l'art de se soigner par les plantes ; mais pas n'importe quelles plantes, les plantes médicinales. Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles. Une telle définition devrait inclure, d'après **Sofowora (2010)**, les cas suivants :

- Plantes ou parties de plantes à usage médicinal dans des préparations galéniques (décoctions, infusions, etc.), comme *l'écorce de bourdaine* ;
- Plantes utilisées pour l'extraction des substances pures soit pour usage médicinal direct ou pour l'hémi-synthèse de composés médicinaux (par exemple hémi-synthèse d'hormones sexuelles à partir de la diosgénine obtenue de *tubercules de Dioscorea*) ;
- Aliments, épices et plantes de parfumerie à usage médicinal, comme le gingembre ;
- Plantes microscopiques (champignons, actinomycètes) employées pour l'isolement de produits pharmaceutiques, en particulier d'antibiotiques. On peut citer l'ergot du seigle (*Claviceps purpurea*) ou *Streptomyces griseus* ;
- Plantes à fibres (comme le coton, le lin, le jute) utilisées pour la préparation de pansements chirurgicaux.

La phytothérapie est profonde, douce et respectueuse du corps ; tout cela est vrai, mais pourquoi ?

L'action de la plante selon **Scimeca** en **2006**, est :

- Pharmacologique et rationnelle, car c'est par la présence de molécules très complexes (les principes actifs) que la plante agit ;

- Systémique et holistique, car une plante n'agit pas sur un seul organe ou une seule cellule mais sur un organisme entier ;

- Globale par cette notion de totum qui est le terme propre à la phytothérapie pour indiquer que dans une plante, tout agit.

La plante entière a toujours une action plus douce, plus large et plus profonde que la substance dite active isolée **(Tétau, 2005).**

### 1.1. Aperçu historique sur l'utilisation des plantes médicinales

Les propriétés des plantes médicinales figurent dans de nombreux livres et permettent à tout un chacun de choisir en connaissance de cause la plante dont il a besoin. Le plus souvent, ces propriétés n'ont pas été découvertes par les recherches modernes, mais font partie d'un savoir ancien, accumulé pendant plusieurs millénaires.

Dès son apparition, il y a 3 millions d'années seulement, l'homme a utilisé les plantes à d'autres fins que de la nourriture. Que la plante soit comestible ou toxique, qu'elle serve à tuer le gibier et l'ennemi ou à soigner, l'homme a découvert par une suite d'échecs et de réussites, l'utilisation des plantes pour son mieux-être.

Le tout premier témoignage de l'utilisation des plantes médicinales figure sur un papyrus égyptien, daté d'environ 2 000 ans avant J.-C. Ainsi, en Inde et en Chine, la médecine faisait amplement appel aux herbes. Plus tard, la Grèce antique se distingue avec les 1ers thérapeutes, comme HIPPOCRATE. Ce médecin dispensa son enseignement sur l'île de Cos, il fut le 1er à mentionner des observations cliniques avec plus de 230 plantes. Puis les plantes furent classées par degré de toxicité, et THEOPHRASTE devint le botaniste le plus marquant de l'antiquité. Il nomma plus de 500 plantes et se livra à des expérimentations... Par la suite, DIOSCORIDE (herboriste grec) écrivit un recueil de plus de 500 plantes en 5 volumes. Cet ouvrage connu sous le nom de « Materia Medica », fut publié pour la première fois en **1478** par l'imprimeur de **Venise Aldó Manuce**. Il constitua la référence principale en Europe jusqu'au XVIIIe siècle, en rassemblant environ 600 plantes (genévrier, orme, pivoine, bardane, etc.). Une illustration est fournie avec le « Juliania Anicia Codex », qui présente des descriptions brèves de plantes, mais surtout des données concernant l'utilisation pratique de végétaux, le type d'indications et les médications. Au moyen âge, les écrits de GALIEN devinrent populaires. Beaucoup de ses 500 livres et

manuscrits furent détruits par un incendie, mais quelque 80 œuvres furent sauvées des flammes. Aujourd'hui, GALIEN est considéré comme l'un des médecins les plus renommés de l'Antiquité après HIPPOCRATE. Il traitait les maladies essentiellement par les plantes médicinales, et ceux qui suivaient ses méthodes constituèrent une secte appelée les « Eclectiques » **(Callery, 1998 ; Wichtl et Anton, 1999 ; Sofowora, 2010).**

Partout dans le monde, les plantes médicinales furent utilisées : les MAYAS, AZTEQUES et INCAS utilisaient la salsepareille, le tabac et le poivre. Puis vint la période du commerce entre l'Europe, le Moyen-Orient, l'Inde et l'Asie... Le développement des explorations furent à l'origine de découvertes importantes.

En **1692**, paraissait la première « Pharmacopée Royale Galénique et Chimique » rédigée par **M. CHARAS**, véritable recueil de préparations médicamenteuses. En **1778**, le premier diplôme d'herboriste était décerné par la Faculté de Médecine de Paris. Le premier codex français parut en 1818 et les éditions se sont succédées jusqu'à la parution de la dernière édition de la pharmacopée européenne par **Wichtl et Anton** en **1999.**

Aujourd'hui, des progrès immenses ont été réalisés par des pharmaciens et des chimistes qui ont étudié des plantes de notre environnement et d'autres plantes exotiques. Les secrets des remèdes d'autrefois commencent à être découverts. Prenons l'exemple du pavot, la morphine fut isolée par **SERTÜRNER** en **1817**, la codéine par **ROBIQUET** en **1832** (il isola aussi l'asparagine de l'asperge), et la papavérine par **MERCK** en **1848**. Bien entendu, les structures chimiques complètes de ces composés furent élucidées bien plus tard.

L'usage des plantes médicinales totales tombe peu à peu en désuétude au profit du principe actif isolé. On pense ainsi obtenir une action plus nette, plus rapide, mieux ciblée. L'industrie chimique intervient en inventant par synthèse des dérivés toujours plus actifs mais aussi plus toxiques. Il faut attendre le XXème siècle pour que des médecins, désabusés par la toxicité de ces nouveaux remèdes, reviennent à l'usage des plantes entières, bien connues de la médecine populaire. Les travaux de l'école française de phytothérapie, avec, en tête **Dr. Henri LECLERC**, ont réactualisé l'emploi des plantes « naturelles » en médecine **(Scimeca et Tétau, 2005).** Cela exprime bien le désir des patients qui veulent être soignés efficacement par des

méthodes non agressives, naturelles, épaulant les forces de la nature. La médecine par les pentes a un avenir admirable et de haut rang. Si elle ne peut tout soigner, elle peut soigner beaucoup **(Tétau, 2005).**

### 1.1.1. De la plante au médicament

Comment extraire ce que la plante peut nous apporter afin d'en faire un médicament ?

Les connaissances empiriques accumulées depuis des milliers d'années ont permis la sélection de plantes pour soigner diverses maladies. Certains de ces usages anciens sont aujourd'hui vérifiés par des études scientifiques et ont conduit à l'isolement de nouveaux principes actifs et/ou à la mise sur le marché de médicaments à base de plantes ou d'extraits standardisés. De la plante entière ou partie de plante utilisée au départ, on a ensuite utilisé des extraits totaux (obtenus par décoction, macération, infusion ou percolation avec différents solvants) liquides ou secs pour faciliter la prise et standardiser les traitements. Les recherches pharmacologiques et chimiques menées pour identifier les effets de ces extraits et en isoler les molécules actives ont mené à la préparation, souvent par les apothicaires de l'époque, de mélanges de constituants actifs, puis à la purification et à la détermination de structure des composés les plus actifs qui ont alors été commercialisés sous forme purifiée **(Figure 1) (Quetin-Leclercq, 2002)**. Ces molécules naturelles ont ensuite servi de modèles pour la synthèse ou l'hémi-synthèse de nouveaux médicaments plus spécifiques, plus actifs, présentant moins d'effets secondaires ou plus facilement brevetables.

Parmi les médicaments les plus utiles en médecine et qui ont été isolés récemment de plantes, on se doit de citer le paclitaxel (taxol), un antitumoral isolé de l'écorce de l'if du pacifique (Taxus brevifolia), ainsi que l'artémisinine, un antipaludique isolé d'une plante chinoise (Artemisia annua) (**Graham et Depovere, 2002).**

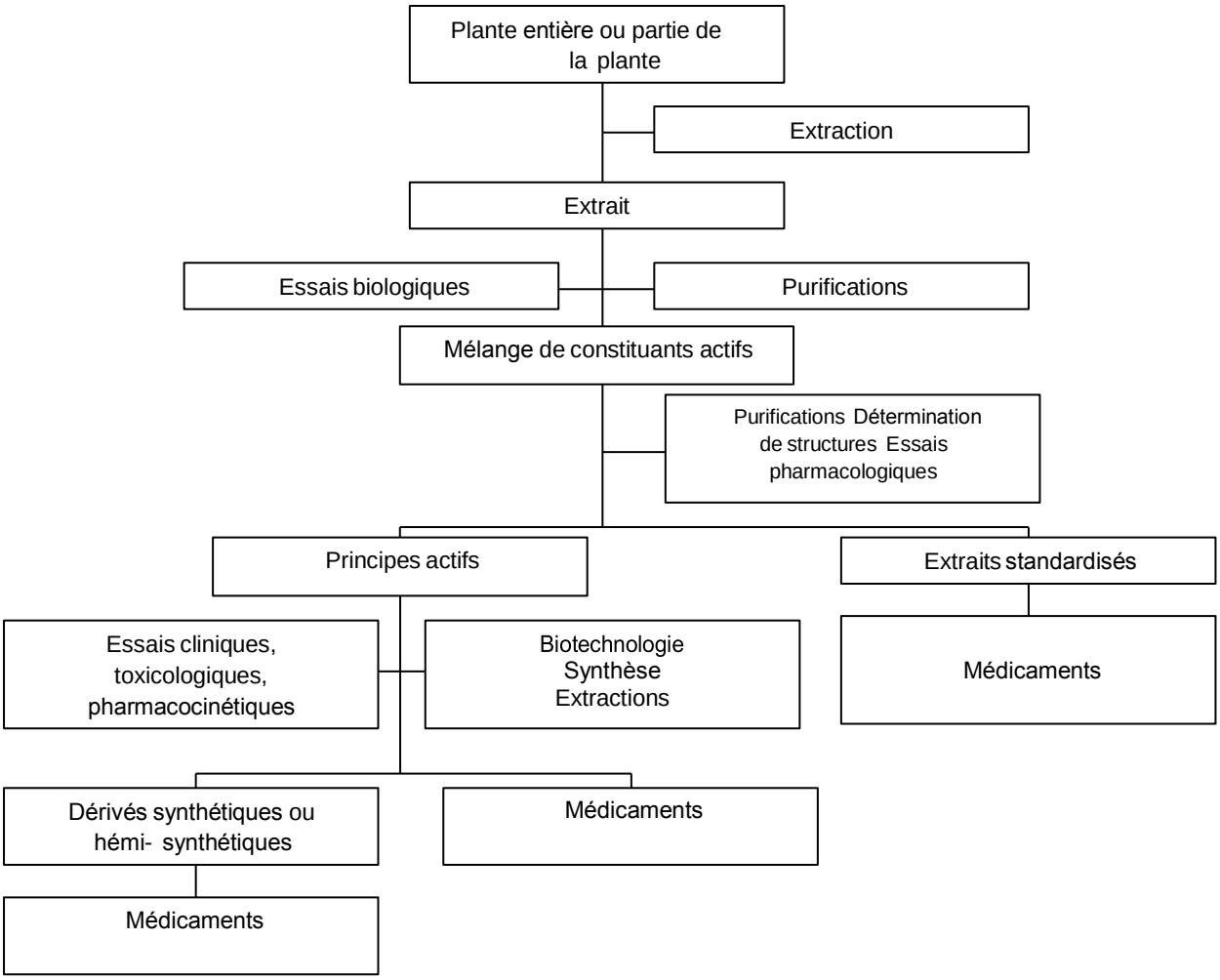



**Figure 1.** De la plante au médicament **(Quetin-Leclercq, 2002).**

De la molécule au médicament, les étapes sont nombreuses, les risques d'échec augmentent au fur et à mesure que l'on approche des derniers tests cliniques : à partir du principe actif qui constitue la découverte et qui pourra être breveté (durée de validité du brevet : 20 ans), des premiers tests d'affinité, de sélectivité et de toxicité, de la mise au point d'une synthèse industrielle efficace et reproductible aux tests précliniques puis cliniques, il se passera 10 à 15 ans. L'investissement nécessaire varie de 500 millions à 1 milliard d'euros, avec une probabilité d'échec proche de 95 à 99% **(Albericio, 2010).** Ces difficultés techniques peuvent être surmontées par la mise en place de méthodes adaptées et de nouvelles stratégies de recherche **(Koehn et Carter, 2005).** Parmi ces stratégies, se trouvent en particulier les « criblages intelligents », par exemple en utilisant des cibles résistantes aux antibiotiques connus pour éviter un « bruit de fond » **(Baltz, 2008),** l'intervention de la robotique par couplage des techniques de séparation par CLHP, d'analyse par spectrométrie de

masse ou RMN et de criblage haut-débit **(Shapiro et Gounarides, 1999 ; Isbell *et al*., 2002 ; Corcoran et Spraul, 2003; Kingston, 2011)**, la métabolomique **(Verpoorte *et al*., 2007)** ou le développement d'outils biologiques comme la métagénomique, qui étudie les gènes et leur fonction dans des échantillons provenant directement de l'environnement, en particulier dans le cas de l'étude des micro-organismes du sol. Cette approche couplée à des techniques de criblage automatisé, permettrait de tester pour une activité biologique de nombreux micro-organismes non encore étudiés **(Handelsman *et al*., 1998; Mocali et Benedetti, 2010).** Ce type d'outils et de stratégies permettent ainsi à la chimie des substances naturelles de s'inscrire clairement dans le cadre des sciences de pointe, ouvertes vers l'avenir.

### 1.2. Les substances naturelles viennent du métabolisme secondaire

Les produits naturels constituent une banque de molécules caractérisées par des structures riches, complexes et fort variées que les chimistes auraient bien du mal à synthétiser dans leurs laboratoires **(Graham et Depovere, 2002)**. Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont indispensables à leur existence. Ceux-ci englobent des protéines, des lipides, des acides nucléiques et des hydrates de carbone qui sont généralement inoffensifs, sauf quelques rares protéines toxiques ou des hydrates de carbone immunomodulateurs, et qu'ils sont par conséquent peu intéressants pour ceux qui étudient l'activité médicinale des plantes. De plus, les plantes contiennent une grande variété de composés secondaires dont la fonction est loin de faire l'unanimité **(Small et Catling, 2000).** Leurs rôles sont encore mal connus, mais il est clair qu'ils interviennent de manière interactive dans les relations entre la plante et son environnement : molécules servant à la défense contre des prédateurs ou des agents pathogènes, à la prédation, à l'adaptation de la plante à son environnement (ex : les molécules piégeant les métaux lourds pour que la plante puisse pousser sur un terrain minier), à la communication, etc. Ils sont les éléments essentiels de la coévolution des êtres vivants ce qui explique leur très grande diversité et leur intérêt particulier pour la recherche de nouveaux médicaments. Ils peuvent être classés en plusieurs grandes familles **(Figure 2),** dont les plus importantes en termes de nombre de structures connues sont les composés phénoliques (tanins, flavonoïdes, …), les composés azotés, avec en particulier les alcaloïdes, et les composés terpéniques.

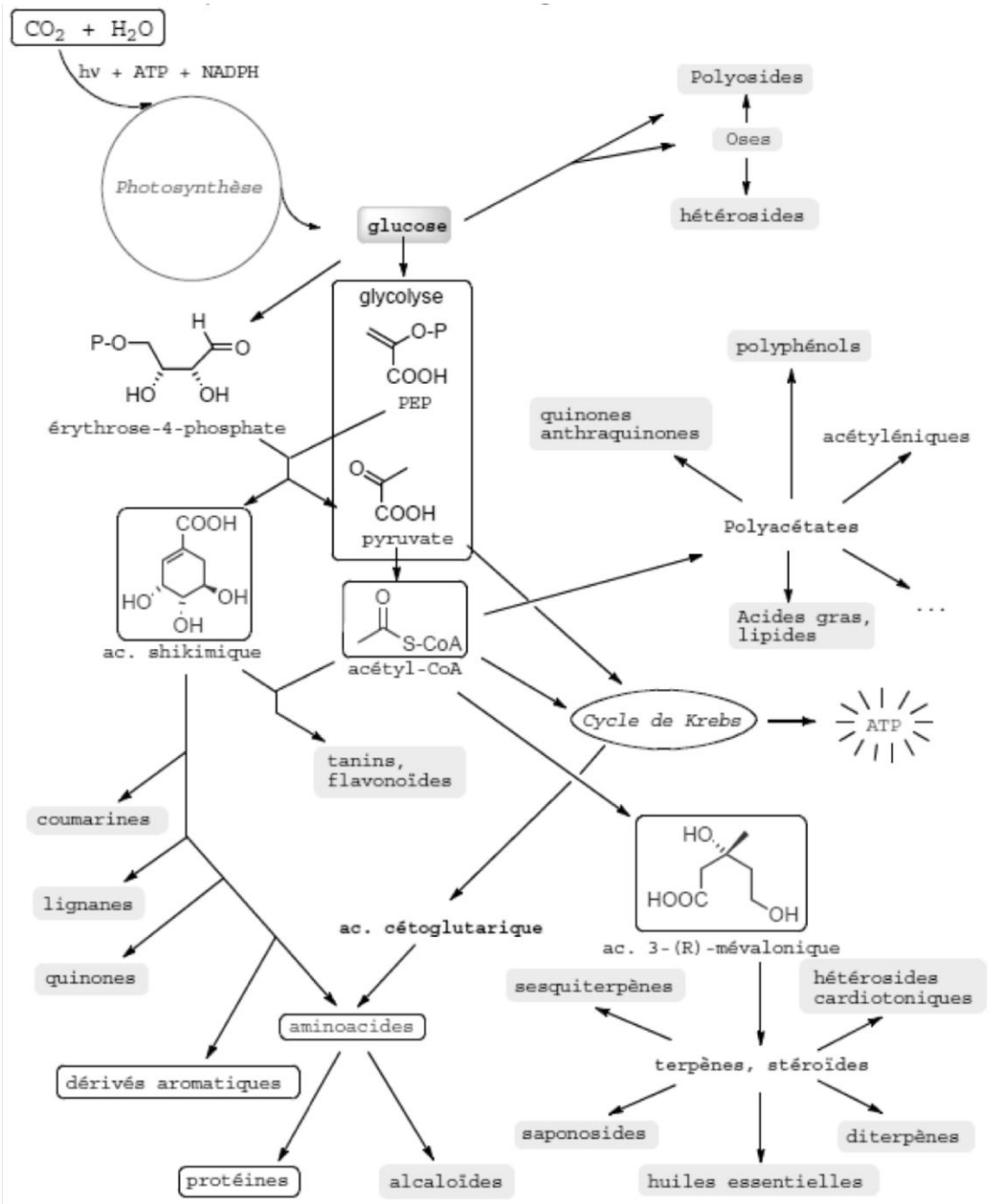



**Figure 2.** Relations biogénétiques entre les principales classes de métabolites secondaires, sources de principes actifs **(Vercauteren, 2011)**

### 1.2.1. Les métabolites secondaires : Une immense diversité de structures chimiques

#### 1.2.1.1. Les composés phénoliques

Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux. Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles **(Macheix *et al*., 2005).** Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagénèse **(Bruneton, 2009)** :

- La voie la plus courante est celle qui, via le shikimate (l'acide shikimique), conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines, etc. ;

- L'autre voie, par de l'acétate et conduit à des poly-β-cétoesters de longueur variable « Les polyacétates » qui engendrent, par cyclisation (réaction de Claisen ou condensation aldolique), des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, orcinols, depsides, depsidones, xanthones, quinones, etc.

La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte (flavonoïdes lato sensu, stilbènes, pyrones, xanthones, etc.). La participation d'un troisième synthon élémentaire « le mévalonate » est également possible bien que moins fréquente : dérivés mixtes du shikimate et du mévalonate comme certaines quinones ou comme les furano- et pyranocoumarines, composés mixtes acétate mévalonate comme les cannabinoïdes. Dans quelques cas, les trois précurseurs concourent à l'élaboration de la même structure : c'est, entre autres, celui des roténoïdes **(Bruneton, 2009).**

Il est classiquement admis que les dérivés des aminoacides qui conservent l'atome d'azote sont des alcaloïdes ou des substances apparentées (amines aromatiques, bétalaïnes). De la même façon, certains mono-, sesqui- et diterpènes peuvent être partiellement désaturés et posséder un hydroxyle phénolique : ils sont considérés

comme des terpènes, l'aromatisation n'étant qu'un phénomène secondaire **(Bruneton, 2009).**

### a Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), correspondant à la structure du diphénylpropane (Santos-Buelga et Scalbert, 2000). Deux cycles aromatiques (A et B) sont liés par une chaîne de 3 carbones formant un hétérocycle oxygéné (C) **(Figure 3).**

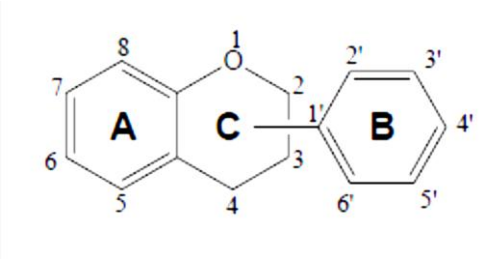
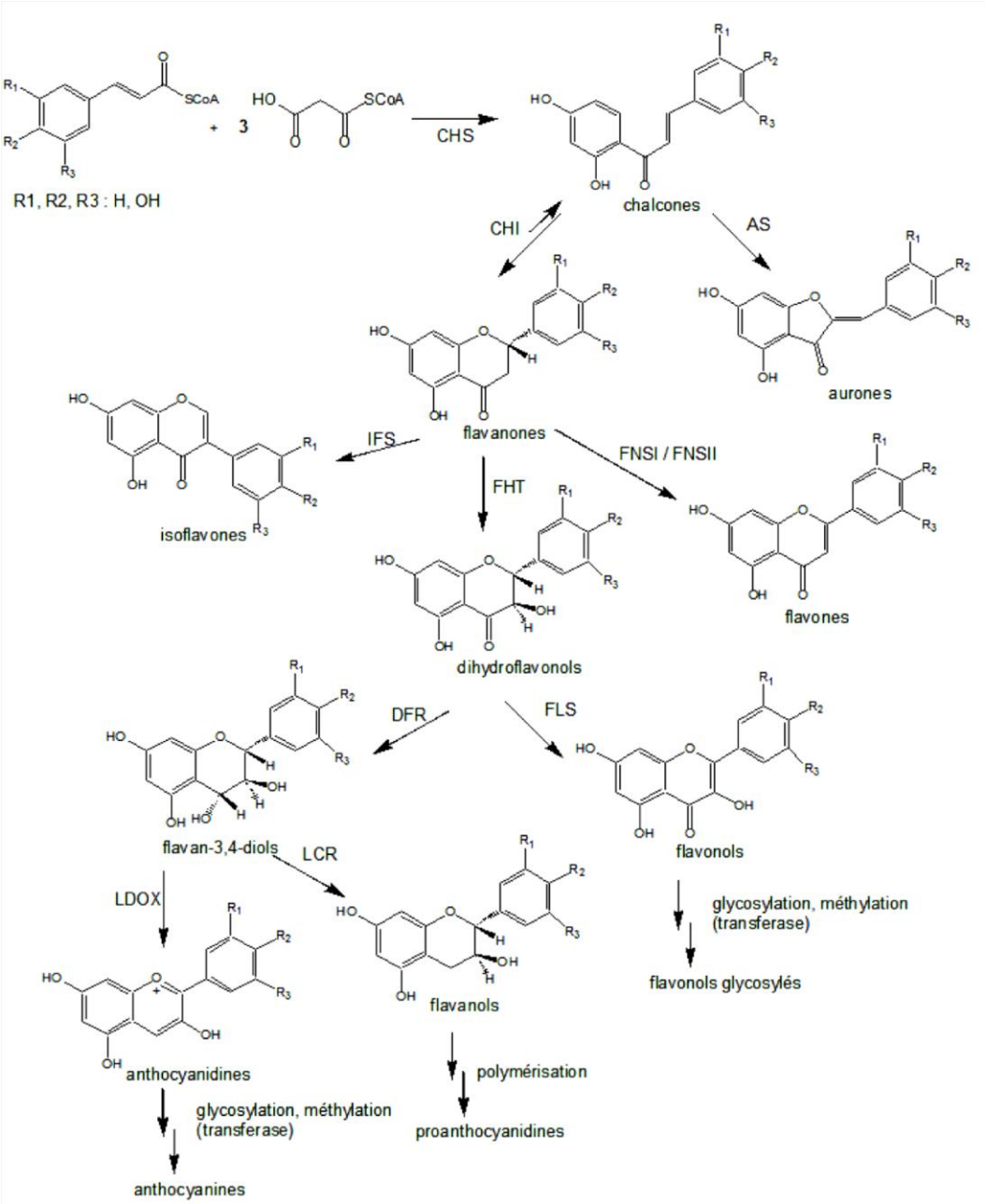



**Figure 3.** Squelette moléculaire de base des flavonoïdes avec la numération classique

L'ensemble des flavonoïdes comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes dont certaines ont une très grande importance biologique et technologique. C'est d'abord la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes. On distingue alors les 4-oxoflavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols et flavanones), les flavanols et les proanthocyanidines, les anthocyanes ainsi que des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones **(Crozier *et al*., 2009).**

Tous les flavonoïdes sont formés via un intermédiaire commun : la 2',4,4',6'- tétrahydroxychalcone (Figure 4). Ce précurseur dérive de la condensation de trois molécules d'acétylcoenzyme A, qui correspondront au cycle A, et d'une molécule de 4-hydroxycinnamatecoenzyme A, permettant la formation des cycles B et C. Ce mécanisme est catalysé par la chalcone synthase. La cyclisation de cette chalcone stéréospécifique par la chalcone isomérase forme la (S)-4',5,7-trihydroxyflavanone conduisant au squelette de base des flavonoïdes. Plusieurs enzymes (synthase, réductase, hydroxylase) contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes. Dans chaque classe de flavonoïde, les molécules sont ensuite diversifiées par hydroxylation (flavonoïde 3'-hydrolase, flavonoïde 3',5'-

hydroxylase), méthylation (O-méthyltransférase), glycosylation (rhamnosyl transférase, flavonoïde glycosyl transférase), acylation (acyl-CoA transférase) ou polymérisation **(Chebil, 2006).**




AS : aurone synthase, CHI : chalcone isomerase, CHS : chalcone synthase, DFR : dihydroflavonol 4-reductase, FHT : flavanone 3-hydrolase, FLS : flavonol synthase, FNSI/FNSII : flavone synthase, IFS : isoflavone synthase, LDOX : leucoanthocyanidin dioxygenase, LCR : leucoanthocyanidin reductase

**Figure 4.** Voies de biosynthèse des flavonoïdes (adaptées de **Forkmann et Martens, 2001 ; Winkel-Shirley, 2002**).

### b Phénols, Acides phénoliques

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïques et cinnamiques. Certains auteurs sont cependant plus restrictifs : ils n'utilisent le terme d'acide-phénol que pour les dérivés en C6-C1 et incluent les dérivés cinnamiques dans le groupe, plus large, des phénylpropanoïdes **(Bruneton, 2009).**

***Phénols simples.*** Les phénols simples (catéchol, guaïacol, phloroglucinol) sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae), le plus souvent à l'état de glucoside du diphénol (arbutoside) ou de son monométhyléther **(Figure 5)**. Les alkylphénols et leurs depsides, issus du métabolisme d'un poly-β-cétoester, sont caractéristiques des lichens. On connait également des alcénylphénols (urushiol) et des monoterpènes phénoliques (thymol).

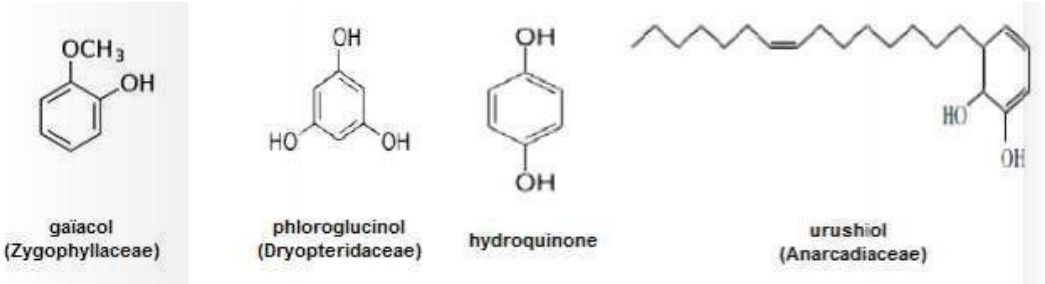
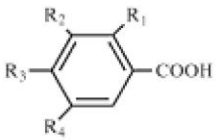



**Figure 5.** Structures chimiques de quelques phénols simples

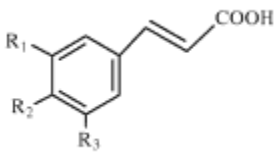
Acides-phénols dérivés de l'acide benzoïque. Les acides-phénols en C6-C1, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside **(Figure 6).**




| | |
|---|---|
| $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$ | acide benzoique (non phénolique) |
| $R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = OH$ | acide *p*-hydroxybenzoique |
| $R_1 = R_4 = H, R_2 = R_3 = OH$ | acide protocatéchique |
| $R_1 = R_4 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = OH$ | acide vanillique |
| $R_1 = H, R_2 = R_3 = R_4 = OH$ | acide gallique |
| $R_1 = H, R_2 = R_4 = OCH_3, R_3 = OH$ | acide syringique |
| $R_1 = OH, R_2 = R_3 = R_4 = H$ | acide salicylique |
| $R_1 = R_4 = OH, R_2 = R_3 = H$ | acide gentisique |

**Figure 6**. Structures chimiques de quelques acides hydroxybenzoïque **(Macheix *et al*., 2005)**

***Acides-phénols dérivés de l'acide cinnamique***. La **figure 7** illustre la structure des principaux acides hydroxycinnamiques (C6-C3) présents dans les plantes. Alors que les acides hydroxybenzoïques se présentent majoritairement sous forme libre, les acides hydroxycinnamiques peuvent exister sous une forme estérifiée par l'acide quinique **(Jalal et Collin, 1977; Borchers *et al*., 2000).** Ils peuvent également être amidifiés (dérivés de la spermidine, de la tyramine ou de la putrescine), ou combinés avec des sucres : esters de glucose (c'est le cas le plus fréquent) ou éthers du glucose (en particulier chez les Apiaceae et les Brassicaceae) **(Bruneton, 2009).**




| | |
|---|---|
| $R_1 = R_2 = R_3 = H$ | acide cinnamique (non phénolique) |
| $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$ | acide *p*-coumarique |
| $R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$ | acide caféique |
| $R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = H$ | acide férulique |
| $R_1 = R_3 = OCH_3, R_2 = OH$ | acide sinapique |

**Figure 7.** Structures chimiques de quelques acides hydroxycinnamiques **(Macheix *et al*., 2005)**

### c Coumarines

Présentes dans de nombreux végétaux, les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer, en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques **(Bruneton, 2009).** Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense de type phytoalexine **(Vivas de Gaulejac, 2001)**. La figure 8 présente la structure de quelques coumarines (ex. : Aesculétine, Scopolétine, Umbelliférone, …) et glycosides de coumarines (ex. : Aesculine, Scopoline, …). Ces composés sont connus pour leurs propriétés anti- coagulantes **(Vivas de Gaulejac, 2001).**

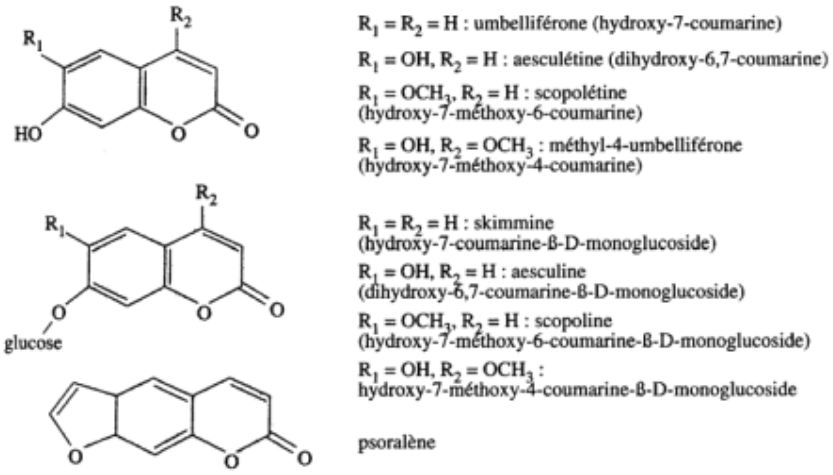



**Figure 8.** Structures chimiques de quelques coumarines **(Vivas de Gaulejac, 2002).**

### d Lignanes, néolignanes et composés apparentés

Les lignanes résultent de la condensation d'unités phénylpropaniques **(Figure 9).** Quatre groupes peuvent être considérés : les lignanes (liaison entre deux carbones β des chaînes latérales de deux unités dérivées du phénylpropane), les néolignanes (un seul carbone β est en jeu), les "oligomères", (condensation de 2 à 5 unités phénylpropaniques) et enfin les norlignanes avec un squelette en C17. Les néolignanes sont surtout présents chez les espèces primitives (Magnoliales, Pipérales) alors que les lignanes se trouvent souvent dans le bois des gymnospermes et dans les tissus soumis à lignification chez les angiospermes **(Krief, 2003).**

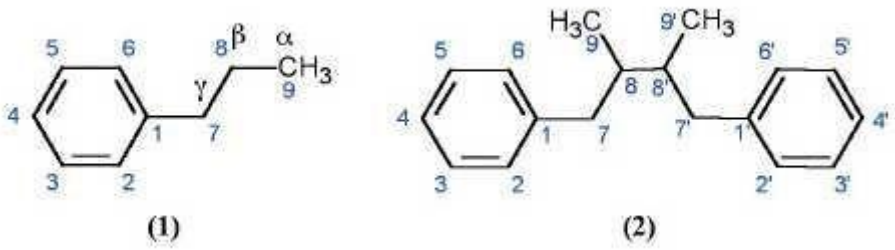


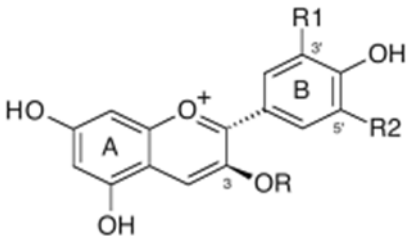

**Figure 9.** Structure et numération des atomes de carbone du phénylpropane (1) et des lignanes (2) (liaison β-β' ou 8,8') **(Moss, 2000).**

### e Anthocyanosides

Les anthocyanes ou pigments anthocyaniques sont des composés hydrosolubles, de teinte rouge, violette ou bleue, qui colorent les fleurs, les fruits et parfois les feuilles.

Les anthocyanes sont présents dans la nature uniquement sous forme d'hétérosides appelés anthocyanosides. Ces pigments sont très répandus dans le règne végétal et proche des flavonoïdes sur le plan de l'origine, de la structure et des propriétés pharmacologiques **(Catier et Roux, 2007).** Leur structure de base **(Figure 10)** est caractérisée par un noyau « flavon » généralement glucosylé en position C3 **(Ribéreau-Gayon, 1968).**

Les anthocyanosides, dont les couleurs vives attirent insectes et oiseaux, jouent un rôle majeur dans la pollinisation et la dispersion des graines. Un fort pouvoir colorant et l'absence de toxicité font de ces hétérosides des colorants naturels susceptibles de remplacer, dans l'industrie alimentaire, les colorants synthétiques : leur innocuité et leur acceptabilité par le consommateur compensent leur instabilité (pH, température, lumière) et leur coût de production parfois élevé **(Bruneton, 2009).**




R = H
R1 = R2 = H: Pélargonidine R1 = OH, R2 = H: Cyanidine
R1 = OCH3, R2 = H, Péonidine R1 = R2 = OH: Delphinidine
R1 = OCH3, R2 = OH: Pétunidine
R1 = R2 = OCH3 : Malvidine
R = Glucose : Si la forme est monoglucoside

**Figure 10.** Structures chimiques de quelques anthocyanidines **(Collin et Crouzet, 2011).**

### f Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant.

Très répandus dans le règne végétal, ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelquefois combinés aux protéines et aux alcaloïdes **(Catier et Roux, 2007).**

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénique :

***Tanins hydrolysables*** : Ce sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acide-phénol **(Figure 11).** Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation (déhydrohexahydroxydiphénique = DHHDP ; acide chébulique) dans le cas des tanins classiquement (mais improprement) dénommés tanins ellagiques **(Bruneton, 2009).**

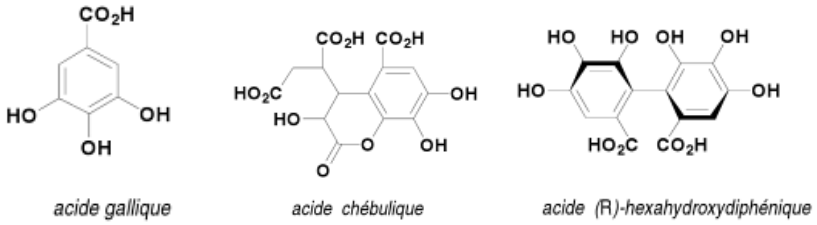



**Figure 11.** Structures chimiques de quelques acides phénols **(Bruneton, 2009).**

***Tanins condensés*** **(Proanthocyanidols)** : Ce sont des polymères flavaniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols (Figure 12) liées entre elles par des liaisons carbone- carbone le plus souvent 4→8 ou 4→6, résultante du couplage entre le C-4 électrophile d'un flavanyle issu d'un flavan-4-ol ou d'un flavan-3,4-diol et une position nucléophile (C-8, plus rarement C-6) d'une autre unité, généralement un flavan-3-ol **(Bruneton, 2009).**

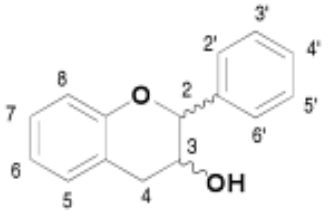



**Figure 12.** Squelette moléculaire d'un flavan-3-ol (Bruneton, 2009).

### g Quinones

Les quinones sont des composés oxygénés qui résultent de l'oxydation de dérivés aromatiques caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diénique (para-

quinones) ou par un motif 1,2-dicétocyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) (Figure 13). La dione peut être conjuguée aux doubles liaisons d'un noyau benzénique (benzoquinones) ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé : naphtalène (naphtoquinones), anthracène (anthraquinones), naphtodianthrène (naphtodianthrone)... **(Krief, 2003 ; Bruneton, 2009).**

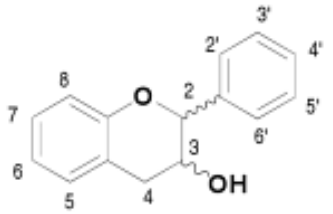



**Figure 13.** Quelques motifs quinoniques **(Bruneton, 2009).**

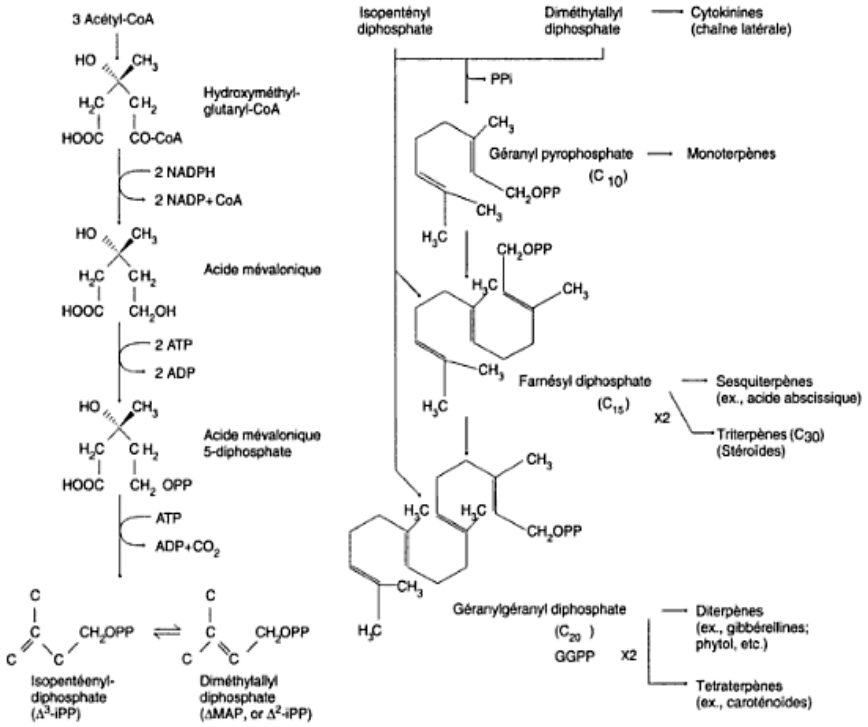
### 1.2.1.2. Quinones

Les quinones sont des composés oxygénés qui résultent de l'oxydation de dérivés aromatiques caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diénique (para-quinones) ou par un motif 1,2-dicétocyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) (Figure 13). La dione peut être conjuguée aux doubles liaisons d'un noyau benzénique (benzoquinones) ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé : naphtalène (naphtoquinones), anthracène (anthraquinones), naphtodianthrène (naphtodianthrone)... **(Krief, 2003 ; Bruneton, 2009).**

### 1.2.1.3. Les terpénoïdes et les stéroïdes

Elaborés à partir des mêmes précurseurs, les terpénoïdes et les stéroïdes constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux **(Bruneton, 2009)**. Les terpénoïdes sont des substances généralement lipophiles, formés par la réunion d'unités pyrophosphate isopenténoïdes à cinq carbones provenant de la voie de l'acide mévalonique **(Judd *et al*., 2002 ; Hopkins, 2003)**. Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui composent la chaîne ainsi que dans les divers modes d'assemblage **(Figure 14)**. La formation de structures cycliques, l'addition de fonctions comprenant de l'oxygène et la conjugaison avec des sucres ou d'autres molécules peuvent rendre leurs structures complexes. La famille des terpènes comprend des hormones (gibbérellines et acide abscissique), des pigments caroténoïdes (carotène et xanthophylle), des stérols (ex. ergostérol, sitostérol, cholestérol), des dérivés de stérols (ex. des hétérosides

digitaliques), le latex (qui est à la base du caoutchouc naturel) ainsi qu'une grande partie des huiles essentielles qui confèrent aux plantes leur parfum ou leur goût **(Hopkins, 2003)**.




A gauche : Synthèse de l'isopentényldiphosphate à partir de l'acétyl-CoA. A droite : Addition séquentielle d'unités d'isopentényldiphosphate produisant des terpènes dont le nombre d'atomes de carbone va en augmentant. Tous les terpènes sont des multiples d'unités à 5 atomes de carbone.

**Figure 14**. Voie de l'acide mévalonique et synthèse des terpénoïdes **(Hopkins, 2003).**

Les ***monoterpénoïdes*** **(Figure 15)** et les ***sesquiterpénoïdes*** volatils **(Figure 16)**, substances à 10 et 15 carbones, sont les principaux composants des huiles essentielles caractéristiques des Magnoliales, des Laurales, des Illiciales et des Pipérales, ainsi que de clades sans relations directes avec ces ordres, comme les Myrtaceae, les Lamiaceae, les Verbenaceae et les Asteraceae. Ces composés ne se trouvent pas seulement dans les tissus végétatifs (dans les cellules sphériques ou dans différents canaux ou lacunes situés dans les tissus parenchymateux), mais aussi dans les glandes florales odoriférantes (où ils sont libérés et fonctionnent souvent comme attractifs floraux).

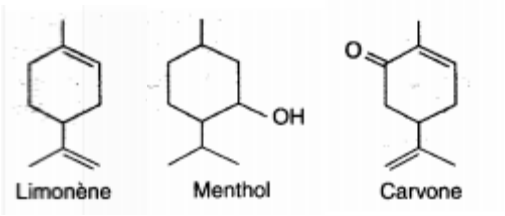



**Figure 15**. Exemples de monoterpènes **(Turner *et al*., 1999).**

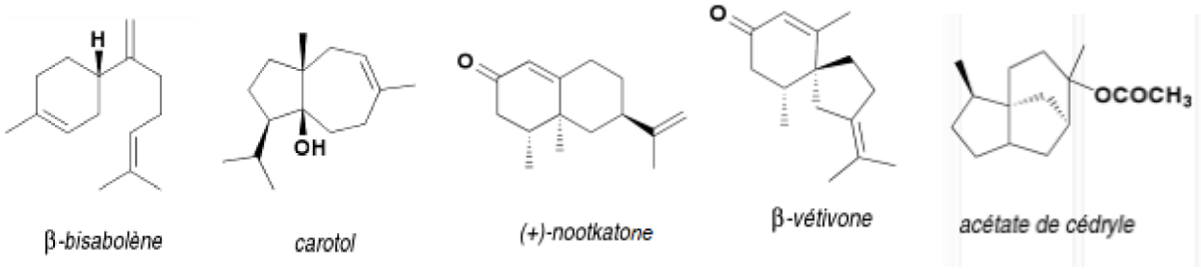



**Figure 16.** Quelques exemples de sesquiterpènes caractéristiques des huiles essentielles **(Bruneton, 2009)**.

Un autre type de terpénoïdes, les lactones sesquiterpéniques (Figure 17), est surtout connu chez les Asteraceae (où ces lactones sont diversifiés et utiles pour la taxonomie), mais on le trouve aussi dans quelques autres familles, comme les Apiaceae, les Magnoliaceae et les Lauraceae.

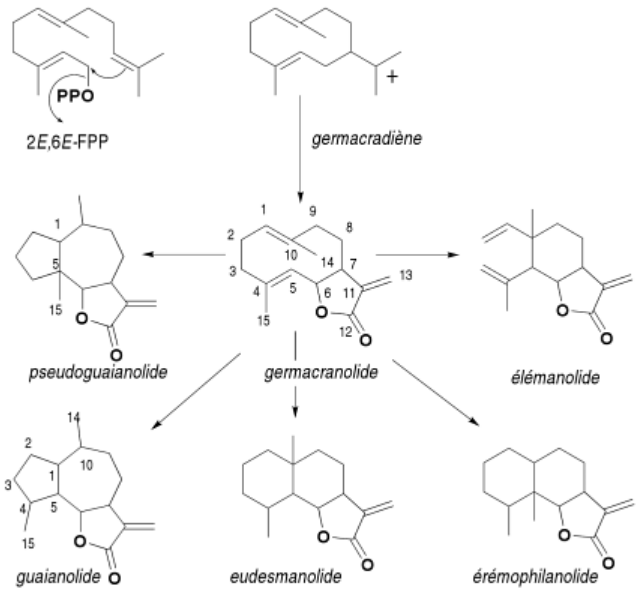



**Figure 17**. Filiation (schématique) des principaux groupes de lactones sesquiterpéniques **(Bruneton, 2009).**

Différents ***diterpénoïdes*** (20 carbones), ***triterpènes*** (30 carbones) et ***stéroïdes*** (triterpènes basés sur un cycle cyclopentane perhydrophénanthrène) sont très répandus et ils ont également une importance systématique **(Figure 18)**. Le triterpénoïdes, bétuline se retrouve dans l'écorce des bouleaux blancs (Betula papyrifera et espèces voisines) ; il est imperméable, très inflammable et pratiquement inconnu en dehors de ce groupe. Les ***saponines triterpéniques*** se rencontrent chez les Apiaceae et les Pittosporaceae et confortent l'hypothèse d'une relation phylogénétique étroite entre ces deux familles. Les ***limonoïdes*** et les ***quassinoïdes***, dérivés de triterpénoïdes apparentés au point de vue de leur biosynthèse, se limitent aux Rutaceae, Meliaceae et Simaroubaceae. Chez les Sapindales ; les quassinoïdes constituent une synapomorphie propre aux Simaroubaceae. Les ***cardénolides*** sont des glycosides très toxiques d'un type de stéroïde à 23 carbones, présents chez les Ranunculaceae, les Euphorbiaceae, les Apocynaceae, les Liliaceae et les Plantaginaceae.

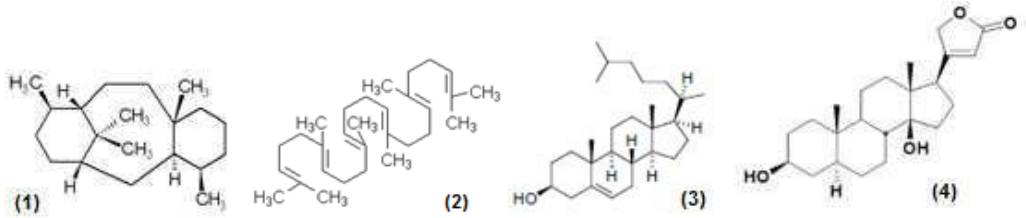



**Figure 18.** Exemples de structures : (1) Taxane (diterpène) ; (2) Squalène (triterpène); (3) Cholesterol (stérols) ; (4) Cardénolides **(Bruneton, 2009).**

Les ***iridoïdes*** **(Figure 19)** sont des dérivés monoterpénoïdes à 9 ou 10 carbones généralement présents sous forme de glycosides unis par un oxygène. On rencontre des iridoïdes dans beaucoup de familles du clade des astéridées, et les types d'iridoïdes ont été utilisés pour confirmer les relations au sein de ce groupe. Les ***séco-iridoïdes***, par exemple, type chimiquement dérivé d'une molécule iridoïde dépourvue de cycle carbocyclique, existent chez les Gentianales, les Dipsacales et de nombreuses familles de Cornales et d'Astérales. Par contre, **les iridoïdes carbocycliques** à deux cycles, dont l'un est formé exclusivement de carbone, sont caractéristiques des Lamiales (à l'exception des Oleaceae). La présence d'iridoïdes chez les Ericales et les Cornales prouve que ces taxons appartiennent effectivement au clade des asteridées, bien qu'ils aient été fréquemment exclus de ce groupe **(Judd *et al*., 2002).**

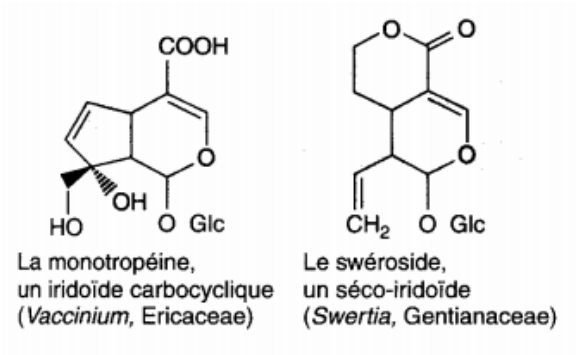



**Figure 19.** Exemples de quelques iridoïdes **(Judd *et al*., 2002).**

### 1.2.1.4. Les alcaloïdes

Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. MEISNER au début du XIXème siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, comme des alcalis (de l'arabe al kaly, la soude et du grec eidos, l'aspect**) (Bruneton, 2009)**. Il n'existe pas de définition simple et précise des alcaloïdes et il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes des autres métabolites azotés naturels.

La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910 : « Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose » **(Zenk et Juenger, 2007)**. Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures **(Roberts et Wink 1998 ; Stöckigt *et al*., 2002).**

On distingue généralement :

- Les alcaloïdes vrais, qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle ;

- Les proto-alcaloïdes, qui dérivent d'acides aminés, dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique ;

- Les pseudo-alcaloïdes, qui présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés.

Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine), dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie, atropine) souvent accompagnés des hypnotiques, ou comme agents antipaludéens (quinine, chloroquinine) ou agents anticancéreux (taxol, vinblastine, vincristine). La figure ci-dessous présente quelques structures alcaloïdiques à usage thérapeutique.

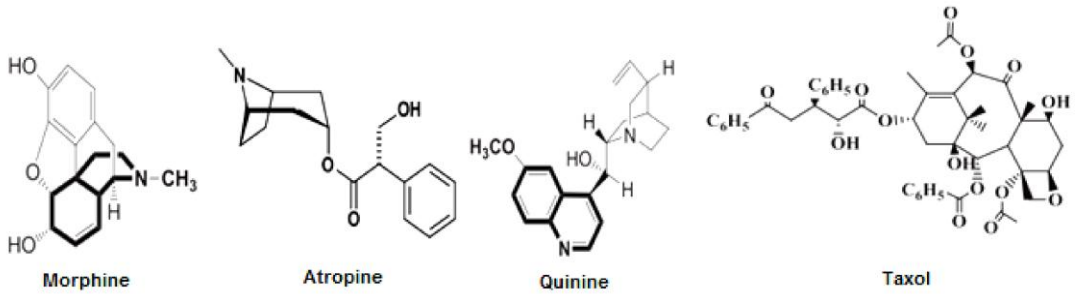



**Figure 20**. Exemples de structures alcaloïdiques **(Badiaga, 2011).**

### 1.2.2. Les composés phénoliques et la santé de l'homme

Des recherches importantes sur les métabolites secondaires sont en cours, compte tenu des bénéfices considérables qu'elles permettent d'escompter, mais aussi des dangers que ces substances comportent pour la santé des hommes.

Comme cela a déjà été signalé, les très nombreuses variations (hydroxylations, méthylations, glycosylations, acétylations, etc..) autour chimiques simples des structures de base (exemples de l'acide caféique, du kaempférol ou de la quercétine) conduisent à une énorme diversité des composés phénoliques et en particulier des flavonoïdes. L'activité biologique de ces molécules et des plantes médicinales qui les accumulent peut varier fortement avec de petits changements structuraux qui entraînent souvent des modifications des interactions moléculaires avec l'eau, les protéines ou les lipides. Dans la plupart des cas, qu'il s'agisse de préparations brutes ou de fractions purifiées, l'action pharmacologique des composés phénoliques est associée à deux propriétés : d'une part, leur capacité à se lier aux protéines (propriété particulièrement marquée pour le groupe des tanins), ce qui peut conduire à l'inhibition d'activités enzymatiques (lipoxygénase, peroxydase, xanthine oxydase, glucosidase, galactosidase,…) et d'autre part, leur caractère antioxydant qui permet de neutraliser les formes activées de l'oxygène ou les radicaux libres à caractère toxique issus de la peroxydation lipidique **(Macheix *et al*., 2005)**. Les formes activées de

l'oxygène sont pour la plupart des radicaux chimiques dérivés de l'oxygène, capables d'attaquer l'ADN, les enzymes, les protéines, les membranes cellulaires, etc. Ces attaques peuvent être responsables de problèmes lors de la réplication de l'ADN entraînant mutations et cancers, de perturbations au sein des cellules qui peuvent conduire à leur mort, de la destruction des membranes cellulaires ; ceci peut mener au durcissement et à l'épaississement des artères mais aussi à des crises cardiaques, de la détérioration du collagène et donc à la rigidité des tissus **(Leitao, 2011).**

Il ne peut être question ici de rentrer dans le détail des multiples interventions des composés phénoliques dans la santé humaine. Nous indiquerons, dans le **Tableau 1**, quelques points particulièrement importants ou qui sont actuellement en évolution rapide et qui présentent un grand intérêt pour la valorisation économique des composés phénoliques :

**Tableau 1.** Quelques exemples de sources végétales riches en composés phénoliques connus pour leurs effets thérapeutiques **(Macheix *et al*., 2005).**

| Plant | Principaux composés | Activité biologique principales |
|---|---|---|
| Ginkgo (feuilles) *Gingko biloba* L. | Flavonols: mono, di et triglycosides du kaempférol, de la quercétine et de l'isorhamnétine. Aglyconesdeflavonolsetflavones. | Effet antioxydant Action neuroprotectrice Action positive sur la circulation cérébrale |
| Soja (jeunes pousses) *Glycine max* L. | Phytoestrogènes du groupe des isoflavonoïdes (génistéine, daidzéine et glycitéine et leurs dérivés glycosylés et acylés) | Action anticancéreuse Troubles de la ménopause Diminution du cholestérol sanguin Protection contre les accidents cardiovasculaires |
| Lin (graines) *Linum sp.* | Phytoestrogènes du groupe des lignanes | Action anticancéreuse Prévention des accidents coronariens |
| Houblon (cônes floraux) Humulus *lupulus* L. | Phytoestrogène : 8-prénylnaringénine Proanthocyanidines (dérivés de la catéchine, de l'épicatéchine, de l'épigallocatéchine) | Action oestrogénique Effet antioxidant |

| | | |
|---|---|---|
| Pin maritime(écorce) *Pinus maritima* L. | Proanthocyanidines à base de catéchine et d'épicatéchine Acides benzoiques et hydroxycinnamiques libres et glycosylés | Effet antioxydant Anti-inflammatoire Inhibition de l'agrégation des plaquettes sanguines |
| Raisin (pépinset vin) *Vitis vinifera* L. | Catéchine, épicatéchine Proanthocyanidines oligomères Tannins condensés | Effet antioxydant Protection contre les affections cardiovasculaires |
| Raisin, vin rouge | Resvératrol | Diminution de l'agrégation des plaquettes sanguines Action anticancéreuse |
| *Podophyllum peltatum* L. | Podophyllotoxine (lignane) | Action anticancéreuse et antivirale |
| Trèfle des prés (jeunes pousses) *Trifolim pratense* L. | Isoflavones (formononétine, biochanine A) | Action phytoestrogénique voisine de celle du soja |
| Luzerne *Medicago sativa* L | Coumestrol | Propriétés oestrogéniques Action anti-inflammatoire |
| Agrumes (fruits) *Citrus sp.* | O- et C-glycosides de flavones et flavonones (naringine, diosmine, hespéridine) Flavones polyméthoxylées | Action anticancéreuse Augmentation du tonus veineux |

## 2. Techniques conventionnelles d'extraction

D'après **Guenther (1949),** les huiles essentielles sont obtenues le plus souvent par distillation.

### 2.1. Distillation – Evaporation

La différence entre distillation et évaporation, est l'intérêt porté aux produits séparés.

Dans la distillation, c'est la phase vapeur qui a de la valeur car elle contient le ou les constituants à séparer, alors que dans l'évaporation, c'est le résidu solide ou liquide obtenu par vaporisation du solvant, qui est le produit intéressant **(Peyron, 1992).**

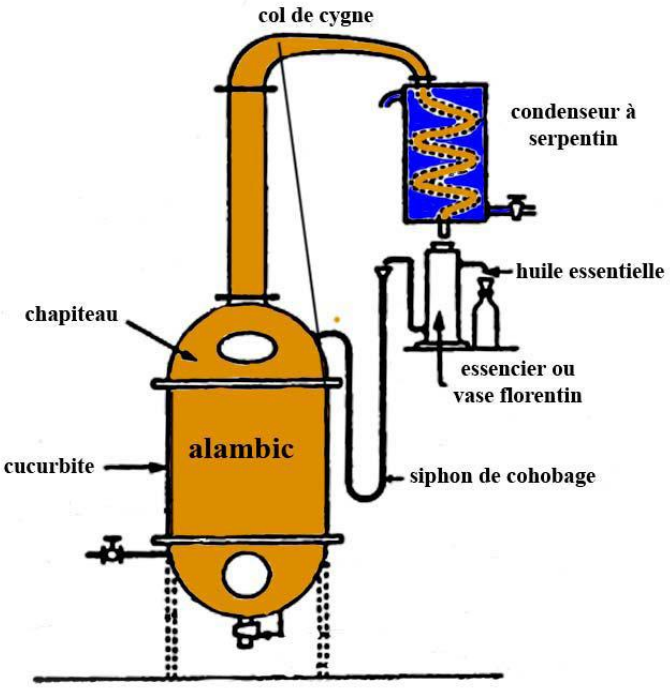
### 2.1.1. Codistillation avec vapeur d'eau

C'est probablement sur le plan tonnage, que la codistillation avec vapeur d'eau est la principale technique de production des huiles essentielles. Trois groupes de techniques sont utilisés :

-La distillation à la vapeur, ou hydrodistillation **(Figure 21, A)**, dans laquelle le végétal est en contact direct avec l'eau bouillante, ce qui évite d'agglutiner les charges végétales comme le fait l'injection de vapeur. Quelques utilisations actuelles : rose, fleurs d'oranger, amande pulvérisée.

- La distillation à la vapeur saturée : le végétal est supporté dans l'alambic par une plaque perforée située à une certaine distance au-dessus du fond rempli d'eau **(Figure 21, B).** Le végétal est en contact avec la vapeur d'eau saturée, mais pas avec l'eau bouillante.

- La distillation à la vapeur directe, saturée ou surchauffée, souvent à des pressions supérieures à l'atmosphérique, est identique à la précédente, sans eau dans le fond de l'alambic, la vapeur étant introduite au-dessous de la charge végétale (ou en dessus dans le système d'hydrodiffusion). Technique la plus utilisée actuellement, elle évite le contact prolongé du végétal avec l'eau en ébullition et la formation de certains artefacts **(Peyron, 1992 ; Garnero, 1996).**



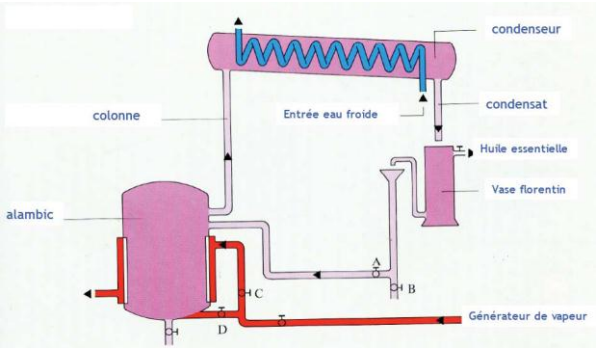



**Figure. 21** Schéma des appareils d'Hydrodistillation (A), et d'entraînement à la vapeur d'eau B) **(Peyron, 1992 ; Garnero, 1996).**

D'une façon générale, l'hydrodistillation, de même que l'entrainement à la vapeur, engendrent des réactions d'isomérisation, de saponification ou de polymérisation. Par ailleurs, le temps de distillation affecte la composition de l'huile essentielle dans la mesure où l'hydrodiffusion des composés volatils présents dans les tissus végétaux à travers les parois cellulaires constitue l'étape limitant du processus. Le mélange huile essentielle–eau est cueilli par un col de cygne et refroidi dans un condenseur : la séparation se fait le plus souvent par simple décantation dans un vase florentin **(Crouzet, 1998).**

### 2.1.2. Codistillation avec un fluide autre que l'eau

L'alcool a été anciennement utilisé pour fabriquer les alcoolates. L'emploi de liquides entraîneurs convenablement choisis (polyols, polyesters et autres composés chimiques à point d'ébullition élevé) s'est généralisé depuis quelques décennies, en codistillant le végétal luimême, ce qui est rare, mais surtout un de ses extraits primaires (huile essentielle, concrète…) sous pression élevée ou très réduite (distillation moléculaire : vide élevé, court trajets des vapeurs). On obtient ainsi d'excellents produits commerciaux, peu colorés, sans odeur empyreumatique **(Peyron, 1992 ; Pellerin, 2001).**

### 2.1.3. Evaporation – concentration

Les miscella évacués des extracteurs, soit par gravité, soit au moyen d'une pompe centrifuge de circulation, sont envoyés dans un décanteur, séparant la phase aqueuse, de la phase huileuse qui est filtrée puis concentrée pour récupérer le solvant.

Notons que « la qualité d'un extrait est en raison inverse de la température maximale mise en œuvre pour son obtention et de la durée d'application de cette température, en particulier dans la concentration du solvant d'extraction » **(Peyron, 1992).**

#### 2.1.4. Rectification (fractionnement)

Cette opération de distillation sous vide consiste à séparer plusieurs constituants d'un mélange liquide par échange de matière entre une phase vapeur et une phase liquide, au moyen d'une série de vaporisations et de condensations entre ce liquide et cette vapeur qui chemine à contre-courant dans une colonne. Elle permet de séparer des composants de mélanges liquides dans un état de grande pureté, voire éliminer les traces d'eau, les matières solubles ou résineuses et les colorants **(Cicile, 1994, 2002 ; Crouzet, 1998).**

#### 2.1.5. Distillation sèche

En chauffant en milieu clos, certains bois (cade, bouleau,…) à des températures élevées, on fabrique des huiles empyreumatiques (cade, bouleau, arôme fumé…) d'importance assez limitée, mais riches en hydrocarbures aromatiques polycycliques cancérigènes **(Peyron, 1992 ;Garnero, 1996).**

### 2.2. Extraction au moyen de solvants

Certains organes de végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau ou l'hydrodistillation. C'est le cas des fleurs de jasmin, d'oeillet, de tubéreuse… Il faut donc, pour ces végétaux, recourir à d'autres méthodes d'extraction des composés odorants volatils telles que l'extraction par les solvants fixes (extraction par les corps gras ou enfleurage) et volatils (extraction par l'hexane) **(Garnero, 1996).**

Ces matières végétales renferment souvent à côté d'une très faible quantité de composants aromatiques, un ballast énorme, solide ou liquide, qu'il faut séparer. Pour séparer ces aromatiques du ballast, deux types d'extraction ont été utilisés :

- L'extraction solide/liquide, c'est-à-dire l'opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide (la matière à extraire), et une phase liquide (le solvant d'extraction). Elle est réalisable :

• Soit par simple contact (à étage unique). L'extraction dans ce cas est souvent incomplète même avec un très bon solvant ;

• Soit par contacts multiples, à co-courants parallèles ou à contre-courant (extraction méthodique), cette dernière est plus économique **(Leybros et Frémeaux, 1990).**

- L'extraction liquide/liquide, c'est-à-dire l'opération de transfert ou d'échange de matière entre deux phases liquides, la solution et le solvant. Il s'agit d'une extraction systématique en continu, utilisée pour extraire un constituant particulier ou pour en éliminer d'autres, en utilisant deux solvants non miscibles à pouvoir dissolvant plus spécifique de chaque groupe **(Moulin *et al*., 2002).**

### 2.2.1. L'enfleurage à froid

Ce processus d'extraction, n'es plus trop utilisé, est réservé aux huiles florales de très grande qualité. Les senteurs particulièrement délicates peuvent également être capturées par enfleurage dans de la graisse froide. Pour ce faire, le mieux est de suspendre simplement les plantes dans un linge immergé dans de l'huile froide et de changer celui-ci après 12 à 24 heures.

Pour pouvoir utiliser la fragrance à la fin, il convient de la délaver de la graisse avec de l'alcool puis de distiller finalement cet alcool selon ses besoins afin de concentrer davantage la senteur.

L'enfleurage constitue en quelque sorte la part royale dans le domaine de la confection de parfums, car il permet également de préserver des senteurs particulièrement délicates dans leur haute qualité et leur pureté. La macération dans l'alcool est sensiblement plus simple et moins dispendieuse ; toutefois, cette méthode n'est en rien comparable à l'extraction des senteurs par enfleurage au niveau de la qualité **(Möller, 2008).**

### 2.2.2. L'enfleurage à chaud

Alternativement à la macération, il est également possible de procéder par l'enfleurage à chaud dans la graisse. Pour cela, il convient de chauffer une graisse animale clarifiée (à défaut de la vaseline ou de la paraffine, substances plus modernes) dans une chaudière en cuivre à 60 degrés. Les plantes y sont incorporées et détrempées pendant 12 à 24 heures. Afin d'obtenir un résultat de qualité, il faut pressurer les plantes et remplir de nouveau la chaudière. Ce processus est répété autant de fois que nécessaire pour assurer le passage d'un maximum d'arômes dans la graisse. Ensuite une opération de filtration est nécessaire pour séparer la graisse des

fleurs. Une pâte parfumée appelée « pommade » qui va être traitée avec la même technique d'extraction que pour un enfleurage à froid **(Möller, 2008).**

### 2.3. Méthodes d'extraction à froid

La pression à froid est le moyen le plus simple mais aussi le plus limité. Cette technique d'extraction est utilisée pour obtenir des essences d'agrumes contenues dans les zestes.

Autrefois, les fruits étaient frottés manuellement sur des parois garnies de picots d'une écuelle de bois. L'huile exprimée était recueillie à l'aide d'une éponge. Elle était ensuite soigneusement filtrée. Quatre à cinq heures sont nécessaires pour traiter une centaine de kilo d'écorces, sans compter les pertes de rendement.

Afin d'augmenter le rendement et de réduire les coûts, de nombreux essais ont été effectués pour mécaniser le procédé. En **1908**, **Perroni-Paladini** suivi de **Lo Castro**, **Marisca** et, plus tard, **Speciale** et **Indelicato** ont inventé des machines ayant une capacité de traitement supérieure (environ 1 tonne/heure). De concepts mécaniques différents, ces machines consistent en deux rouleaux sur lesquels tourne une chaîne spéciale, avec des éléments déformables. Après extraction du jus par "birillatrice", les écorces sont entraînées en tournant entre la chaîne et un plateau horizontal nervuré fixe. Des jets d'eau permettent de récupérer l'essence et l'émulsion est ensuite centrifugée. Ces machines **(Figure 3)** sont appelées « Sfumatrice ».

En appliquant des systèmes plus performants, Speciale et Indelicato ont mis au point de nouvelles machines telles que la "Super-Sfumatrice" et, plus récemment "AZS-204 " permettant l'extraction automatique et simultanée du jus et de l'huile essentielle, avec des capacités supérieures à 2 tonnes/heure. Le fruit est coupé en deux par une lame fixe et les moitiés tombent dans des coupelles dans lesquelles elles sont pressées par des têtes rotatives pour récupérer le jus.

Elles sont ensuite entraînées entre un rouleau et un plateau fixe où l'essence est récupérée avec des jets d'eau. L'émulsion eau - essence est séparée par centrifugation **(Dugo et Di Giacomo, 2002).**

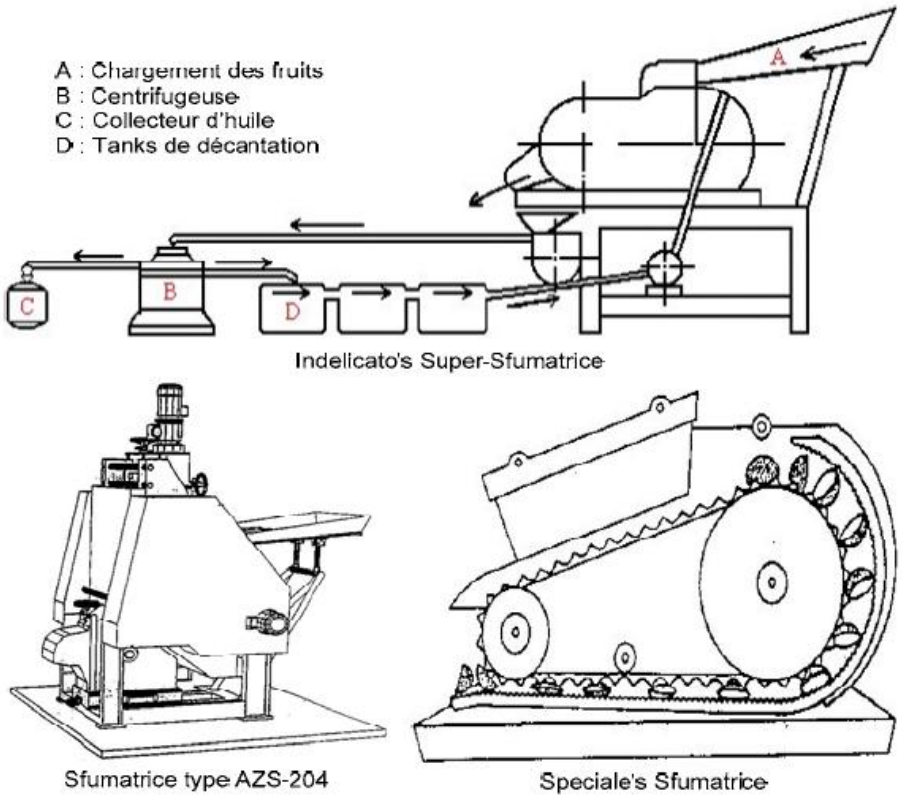



**Figure. 22** Schéma des différents Sfumatrices **(Perroni-Paladini, de Lo Castro, Marisca, Speciale et Indelicato, 1908).**

Poursuivant leurs recherches pour améliorer l'extraction de l'essence à partir du fruit entier, Ando, Avena, et plus récemment Speciale et Indelicato, ont développé une nouvelle méthode d'extraction appelée « Pelatrice » largement diffusée dans le monde. Les fruits sont envoyés dans une machine comportant trois couples de rouleaux en acier inox percés de trous comme une râpe, tournant en sens contraire et forçant les fruits à tourner sur eux-mêmes afin d'en râper toute l'écorce. Des jets d'eau récupèrent l'essence formant une émulsion. Celle-ci est séparée puis clarifiée dans plusieurs centrifugeuses **(Kimball, 1999 ; Dugo et Di Giacomo,2002).**

La société américaine FOOD MACHINERY CORPORATION (F.M.C.), est ensuite arrivée sur le marché avec sa "FMC- IN-LINE", qui extrait simultanément le jus et l'essence (Figure 5). Les extracteurs sont équipés de quatre têtes d'extraction, chacune d'elles étant constituée d'un bol inférieur et d'un bol supérieur mobile qui compriment le fruit. Des couteaux supérieurs et inférieurs tranchent le fruit pendant le mouvement de descente du bol supérieur. Le jus est ainsi pressé dans un tuyau tamiseur qui se comprime pendant le mouvement ascendant synchronisé du tuyau d'écoulement.

Parallèlement, l'essence obtenue est écoulée latéralement lorsque les cellules du zeste (flavedo) éclatent lors de la descente du bol supérieur **(Kimball, 1999).**

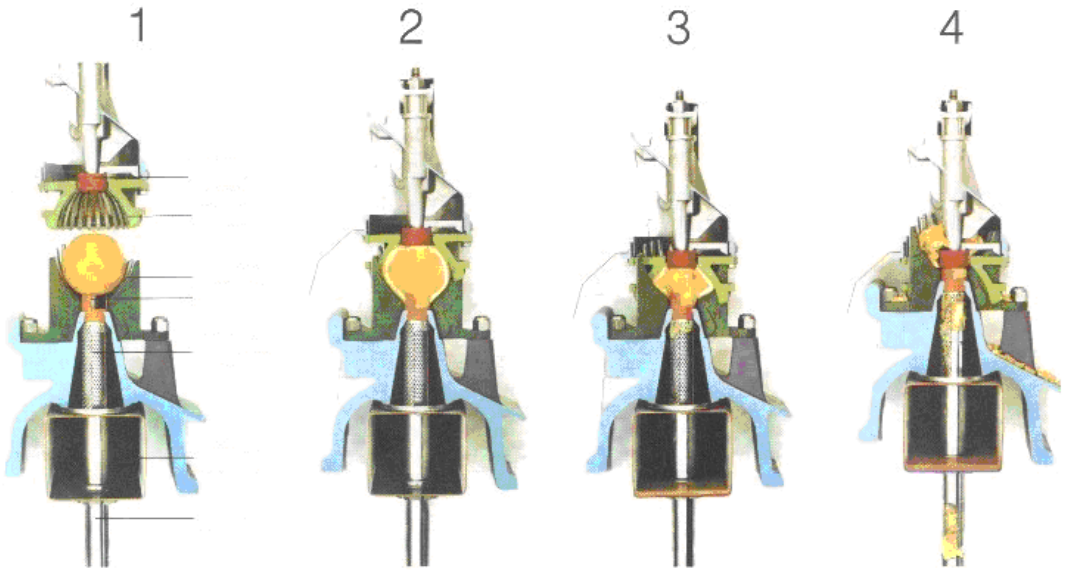



**Figure. 23** Schéma représentatif de l'extraction par FMC in line **(Kimball, 1999).**

### 2.4. Méthode d'hydrodiffusion

L'hydrodiffusion (Figure 24), est une co-distillation descendante. Dans ce procédé, le végétal est disposé dans un parallélépipède métallique grillagé. On soumet donc le végétal à une pulsion de vapeur d'eau, saturée et humide, mais jamais surchauffée de haut en bas. La forme de l'appareillage permet une meilleure répartition des charges. La vapeur d'eau emporte avec elle toutes les substances volatiles. L'huile essentielle est recueillie grâce à un collecteur qui permet un équilibre avec la pression atmosphérique. On peut aussi préciser qu'il y a un procédé de cohobation qui renvoie dans la chaudière toutes les eaux qui sont séparées des huiles **(Wijesekara *et al.*, 1997).**

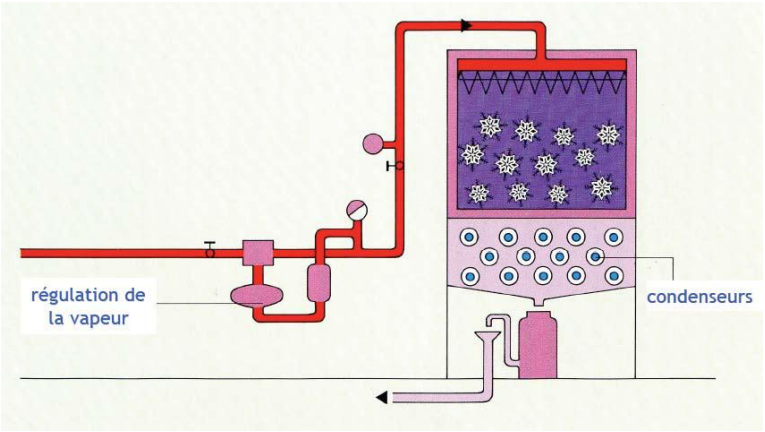



**Figure. 24** Schéma du procédé d'hydrodiffusion **(Wijesekara *et al.*, 1997)**.

### 2.5. Extraction par des techniques innovantes

Pluiseurs méthodes d'extraction vont être décrites ci-dessous y compris celles par fluide supercritique, par ultrasons et enfin par micro-ondes. Ce sont des techniques qui répondent à bon nombre d'exigences actuelles en termes de durabilité, de répétabilité et de respect de l'environnement, de vitesse et d'automatisation.

#### 2.5.1. Extraction par des solvants supercritiques

C'est une nouvelle technologie utilisée industriellement qui fait encore l'objet de nombreuses recherches. L'originalité de cette technique repose sur le comportement du solvant utilisé sous des conditions particulières puisque au-delà d'un certain point, dit point critique, caractérisé par une température (Tc) et une pression (Pc), les corps purs se trouvent dans un état particulier dit supercritique. Dans leurs conditions d'utilisation, les fluides supercritiques ont une masse volumique voisine de celle des liquides, une viscosité proche de celle des gaz et une diffusivité intermédiaire ; leur polarité est modifiée par rapport à l'état liquide. Leur pouvoir dissolvant dépend fortement de la température et de la pression **(Perrut, 1999).**

Le fluide supercritique le plus utilisé est le dioxyde de carbone **(Pellerin, 1991, 2001).** Le CO2 est thermodynamiquement stable, insipide, inodore et incolore, il est ininflammable mais peut être asphyxiant à haute concentration. Son point critique est de Pc = 73,6 bar et Tc = 31,4 °C.

Dans cet état, l'extrait devient insoluble dans le CO2 et précipite au fond de l'enceinte. Le gaz carbonique est ensuite liquéfié et peut être à nouveau utilisé **(Figure 25).**

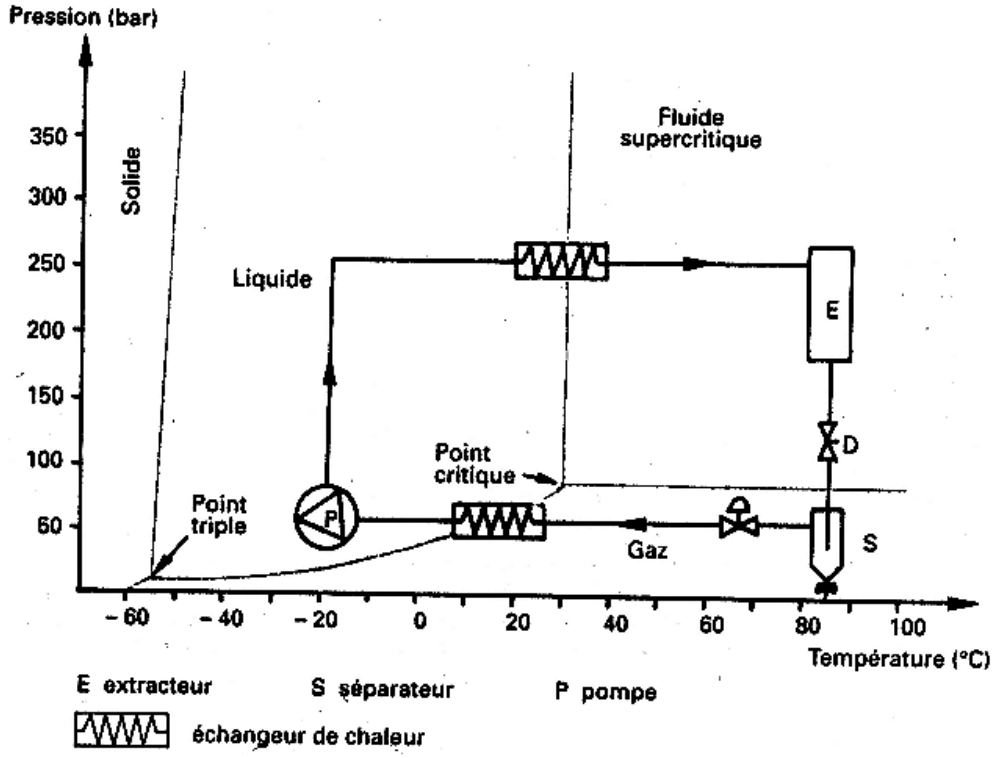



**Figure. 25** Schéma de principe d'une extraction par CO2 supercritique **(Pellerin, 2001).**

L'extrait récupéré ne contient aucune trace de solvant résiduel qui est facilement éliminé sous forme gazeuse. Le CO2 est ensuite recyclé et ramené à l'état supercritique. Afin d'extraire les composés les plus volatils dont la composition est de type « huiles essentielles », on utilise des pressions d'extraction modérées (entre 80 et 100 bar). A des pressions plus élevées (200 à 280 bar), on extrait également des composés plus lourds dont la composition est de type « concrètes ». Evidemment selon les conditions opératoires, on peut en théorie obtenir tous les extraits intermédiaires. Le rendement est alors beaucoup plus élevé. Les extractions sont rapides ; il faut compter environ 90 min pour extraire 500 g de matière végétale **(Pellerin, 2001).**

Le CO2 étant une molécule apolaire, il extrait préférentiellement les composés apolaires.

Cependant, à des pressions élevées, la polarité du CO2 augmente et il va extraire des composés de plus en plus polaires **(Anklam *et al*., 1998).** Étant donné que l'on chauffe très peu la matière première, les composés thermosensibles et hydrolysables ne sont pas dégradés. Cependant, le CO2 présente une certaine acidité, il peut se

former de l'acide carbonique, pouvant entraîner une légère hydrolyse acide. L'extrait obtenu par extraction au CO2 supercritique est un des extraits qui se rapproche le plus de la matière première **(Pellerin, 1991).**

L'extraction au CO2 supercritique entièrement « verte » semble être viable avec l'ajout de cosolvants qui sont introduits à l'aide d'une pompe à débit constant. L'éthanol et l'eau sont les plus utilisés à cause de leurs polarités comme co-solvants/réactifs intermédiaires, et l'eau dans le domaine compris entre le point d'ébullition et les conditions supercritiques. Ainsi, l'extraction est moins sélective, plus de composés sont extraits, le rendement en est amélioré. D'autres solvants peuvent être utilisés. Cependant, leur utilisation supprime certains avantages majeurs rencontrés lors de l'utilisation du CO2. En effet, avec un co-solvant, il est possible de perdre des composés volatils lors de l'étape de concentration **(Anklam *et al*., 1998 ; King, 2004).**

L'appareillage est assez coûteux car il doit pouvoir supporter des pressions allant jusqu'à 300 bar en toute sécurité et permettre ainsi un éclatement des poches à essence et un entraînement des substances aromatiques.

L'extraction aux fluides supercritiques, le plus souvent du CO2, permet d'extraire des substances odorantes peu volatiles et plus particulièrement les matières sèches qui sont récalcitrantes aux méthodes d'extraction traditionnelles. De ce fait, elle a été utilisée pour extraire les composés aromatisants de nombreux aliments comme des épices **(Duarte *et al*., 2004),** du riz **(Bhattacharjee *et al*., 2003)**, diverses boissons **(Senorans *et al*., 2003)** et du café **(Sarrazin *et al*., 2000).**

Autre avantage, ce gaz ne pollue pas et est inoffensif car il est recyclé à l'intérieur du système.

Les huiles essentielles extraites de cette manière ont l'avantage d'éviter la dégradation thermique associée à la distillation à pression atmosphérique. L'avantage, bien sûr, c'est qu'aucun résidu de solvant ne reste, puisque, aux pressions et températures normales, le CO2 revient simplement à l'état gazeux et s'évapore.

L'extraction aux fluides supercritiques est donc une technique intéressante qui apporte de nouvelles notes olfactives (méthode d'extraction plus complète et moins dégradante). Le développement de cette technologie continue à s'appuyer sur des

traitements et/ou des produits qui n'affectent pas l'environnement et les consommateurs. Le changement des températures et/ou des pressions réduites des fluides critiques offre une profusion d'opportunités, dont un excellent exemple est constitué par l'état critique relatif de l'eau. Par exemple, l'eau sous-critique fournit, légèrement au-dessus de son point d'ébullition, un milieu unique imitant celui des solvants organiques polaires, qui a même été utilisé pour l'extraction des solutés thermiquement labiles ou dans la chimie réactionnelle **(King, 2004 ; Turner, 2006).**

### 2.5.2. Extraction par Détente Eclair (Flash–Détente)

La Flash–Détente brevetée par **l'INRA** en **1993**, fut mise au point pour extraire les arômes de bananes, de mangues ou de lichis.

Le flash détente **(Figure 26)**, est un procédé multiusages, multi-effets **(Brat, 2001).** Cette technique se réalise en deux étapes, la première consiste à étuver la matière végétale à 85 – 90°C par l'utilisation d'une vis à injection de vapeur. La seconde est une détente avec introduction brutale sous vide (environ 30 mbar) du matériel végétal (fruits, légumes, plantes, etc.). La température d'ébullition de l'eau dans ces conditions de vide se situe entre 27 et 30°C. Cette mise sous vide instantanée provoque donc l'évaporation brutale d'une partie de l'eau de constitution du matériel végétal étuvé (environ 10 % de la masse humide initiale) et une chute brutale de la température du milieu. Cette perte d'eau instantanée engendre un broyage fin dû à la création de micro-canaux intercellulaires. Ce bouleversement et cette explosion cellulaire confèrent aux produits des qualités physico-chimiques, rhéologiques et organoleptiques bien particulières. Les eaux d'évaporation sont récupérées séparément par condensation : ces eaux, particulièrement riches en composés volatils aromatiques, sont appelées eaux aromatiques et pourront être réintroduites dans les produits après l'extraction par Flash- Détente.

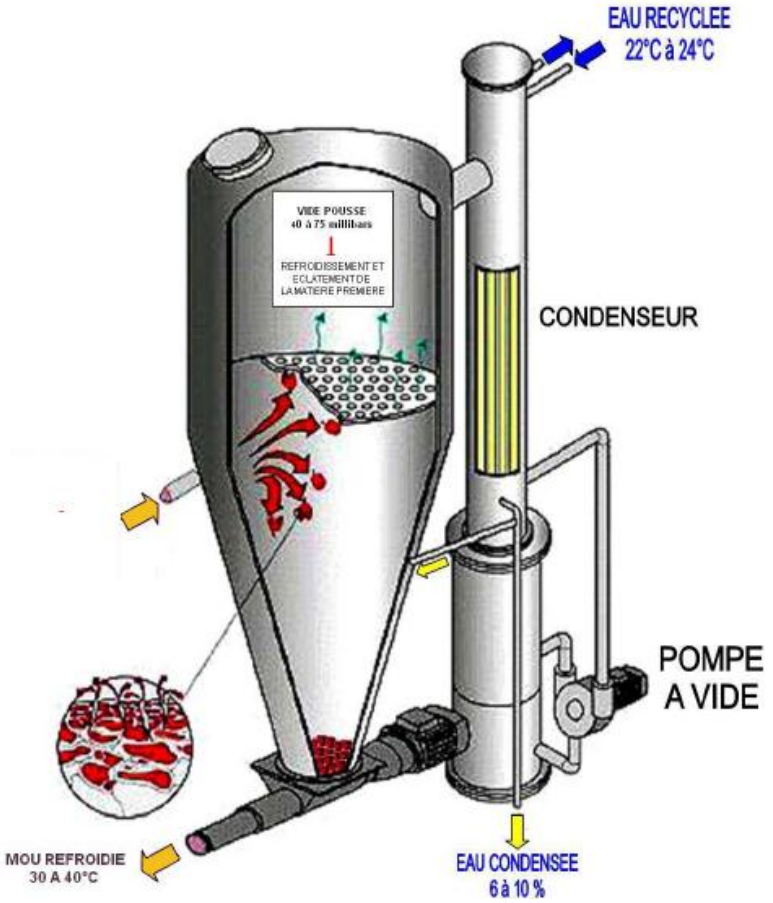



**Figure. 26** Schéma de l'extraction par Flash Détente **(Brat, 2001).**

Des essais ont été effectués par le **CIRAD** (**Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement – France** ) pour l'extraction des huiles essentielles d'écorces d'agrumes (pomelo, orange, mandarine, citron), préalablement étuvées dans la chambre de vide, provoquant l'explosion des glandes à huiles essentielles contenues dans le flavedo. Les huiles seront donc vaporisées simultanément avec une partie de l'eau présente dans les écorces. Après condensation, les huiles seront récupérées sous forme d'émulsion aqueuse, puis purifiées par centrifugation. Les rendements d'extraction obtenus à partir d'écorces de citron, d'orange, de mandarine et de pomelo sont respectivement égaux à 44 %, 29 %, 33 % et 27 %. Après déterpénation, les huiles essentielles extraites par le procédé de Flash-Détente sont de qualité supérieure à celles des huiles fraîchement pressées et ce, avec des proportions relatives supérieures en aldéhydes mono- et sesquiterpéniques.

En plus de l'extraction des huiles essentielles d'agrumes, cette technique permet, de produire simultanémént de la purée de fruits (aux propriétés sensorielles renforcées)

avec un rendement avoisinant les 75 %. Donc de 1000 kg de fruits introduits nous recevons 750 kg de purée de fruits, 330 kg de drêches de citrons et 100 kg d'eaux aromatiques de citron et d'huiles essentielles. La Flashe Détente présente ainsi d'une part un intérêt technologique et économique en améliorant et en développant les propriétés sensorielles et nutritionnelles des produits qui en sont issus ; et d'autre part un intérêt environnemental par la réduction des volumes transportés, la diminution de la charge organique des effluents et la valorisation de l'alimentation du bétail (digestibilité améliorée et durée de vie accrue).

### 2.5.3. Détente Instantanée Contrôlée

Cette méthode d'extraction est née des études théoriques menées par le Professeur **Allaf (1989)** sur l'expansion par extrusion et suivies de travaux expérimentaux. La Détente Instantanée Contrôlée est fondée sur la thermodynamique de l'instantanéité et des processus d'autovaporisation couplée à l'évolution hydro-thermo-mécanique de nombreux polymères à usages alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, etc… **(Allaf *et al*., 1994 ; Rezzoug *et al*.,1998).**

Le traitement par "Détente Instantanée Contrôlée D.I.C." est utilisé en vue d'extraire les arômes et les huiles essentielles à partir de végétaux adéquats naturels ou préalablement séchés.

En effet, appliquée aux végétaux, la D.I.C. permet la modification de leur structure, provoquant ainsi leur texturation et facilitant alors les opérations de transfert de matière. L'auto–vaporisation qui accompagne la détente implique la séparation liquide-solide et permet donc l'extraction de composés spécifiques. Cette opération se distingue par un traitement thermique très localisé, durant un temps réduit (quelques dizaines de secondes).

Comparée aux autres procédés traditionnels, la D.I.C. **(Figure 27)**, est relativement rapide, et donc nettement plus flexible. D'un rendement supérieur, la méthode est comparable à l'extraction par CO2 supercritique au niveau de la qualité de l'extrait, alors que la consommation énergétique est inférieure à celles de la distillation et par entraînement à la vapeur. Les différents aspects de la qualité sont ainsi couplés : ceux du produit fini, ceux du procédé et ceux de son impact environnemental :

• Vecteur qualité: Améliorer la qualité de l'extrait obtenu par élimination de la dégradation thermique et de la présence de solvants résiduels.

• Vecteur environnemental: Réduire les rejets de solvants, d'eau usée et de matières résiduelles.

• Vecteur énergétique: Réduire la consommation énergétique nécessaire à l'extraction des huiles essentielles.

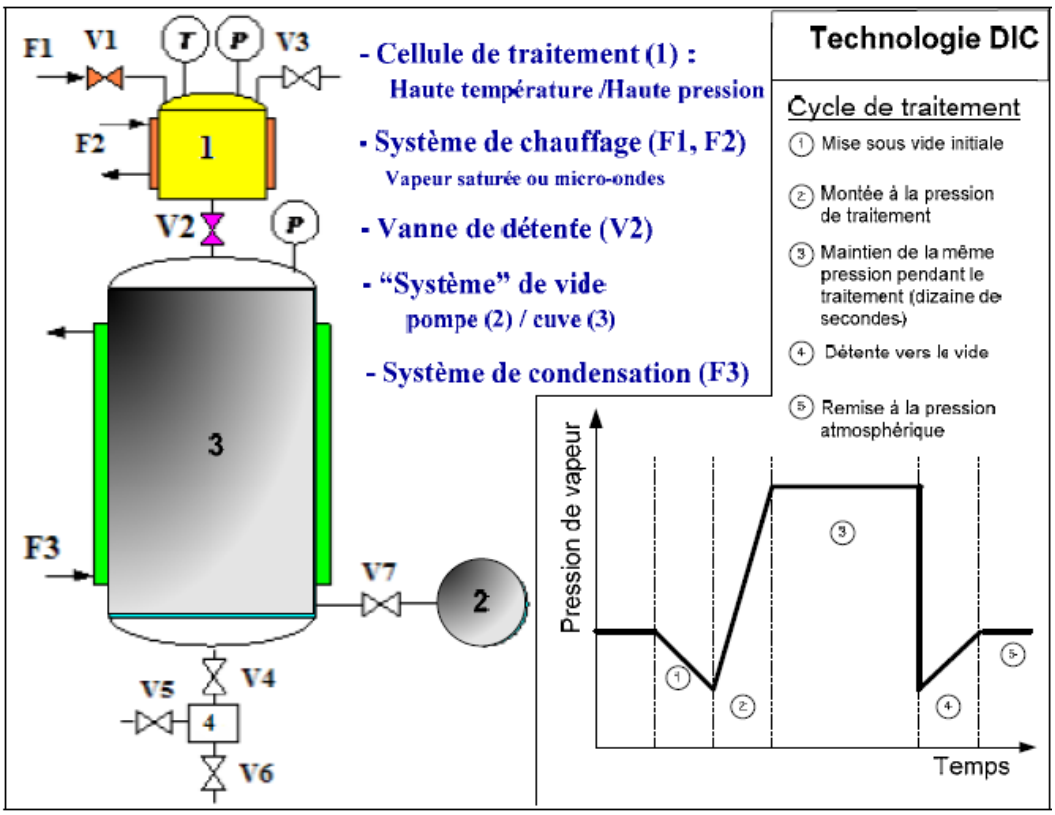



**Figure. 27** Schéma d'une unité de Détente Instantanée Contrôlée (DIC) et son cycle de traitement **(Rezzoug *et al*., 2005)**.

La Détente Instantanée Contrôlée (DIC) trouve des applications diverses dans le séchage des fruits et légumes, et dans la décontamination microbienne. Elle offre également des avantages économiques (vitesse, coût), et qualitatifs (stérilisation, qualités organoleptiques, contenu en vitamines) **(Rezzoug *et al*., 2005).**

### 2.5.4. Extraction par ultrasons

L'extraction des composés bioactifs par ultrasons (20 – 100 kHz) est une technique émergente qui offre beaucoup de reproductibilité en peu de temps, trois fois plus rapide qu'une extraction simple par solvant. Elle est facile à mettre en œuvre et peu

consommatrice de solvant et d'énergie **(Chemat *et al*., 2008).** En effet, la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant, et en même temps elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique peut être utilisée pour l'extraction des composés aromatique ou des essences de plantes, mais elle a surtout été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique **(Salisova *et al*., 1997 ; Vinatoru *et al*., 1997 ; Vinatoru *et al*., 1999 ; Vinatoru, 2001 ; Chemat *et al*., 2003 ; Chemat *et al*., 2004a ; Luque de Castro *et al*., 2007).**

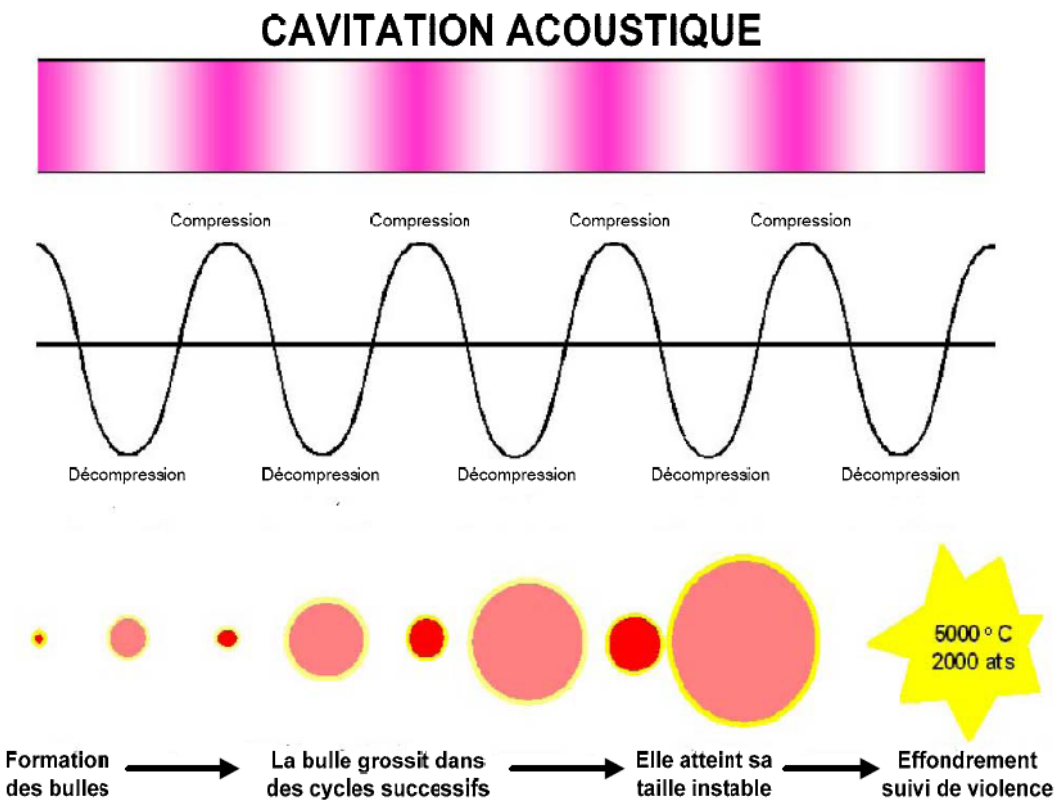



**Figure. 28** Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore **(Vinatoru ,2001).**

Pendant la sonication, les ondes sonores utilisées induisent des vibrations mécaniques dans le solide, le liquide ou le gaz, à travers une succession de phases d'expansion et de compression, comme au cours d'un phénomène de cavitation. Les bulles, formées par l'expansion, vont se développer puis dégonfler. Si ces bulles se situent près d'une surface solide, alors le dégonflement sera asymétrique, ce qui produira des jets de liquide ultra-rapides **(Figure 28).**

D'après **Vinatoru (2001)**, les mécanismes d'extraction impliquent deux phénomènes physiques :

- Les molécules peuvent parfois traverser la paroi cellulaire par simple diffusion ;

- Le contenu des cellules peut être « lessivé» après destruction des parois cellulaires, afin de récupérer l'ensemble des composés d'intérêt.

Les ultra-sons permettent d'améliorer ces deux phénomènes. Ils pourraient augmenter le rendement, diminuer la quantité de solvant nécessaire et/ou le temps de traitement **(Mason et Cintas, 2002).**

### 2.5.5. Extraction assistée par Micro-ondes

Les rayonnements micro-ondes sont des ondes électromagnétiques qui se propagent dans le vide à la vitesse de la lumière. Elles sont caractérisées par une fréquence comprise entre 300 MHz et 30 GHz, c'est-à-dire par une longueur d'onde comprise entre 1 m et 1 cm. Sur le spectre électromagnétique **(Figure 29)**, elles sont situées entre les radiofréquences et les infrarouges **(Kingston et Haswell, 1997).**

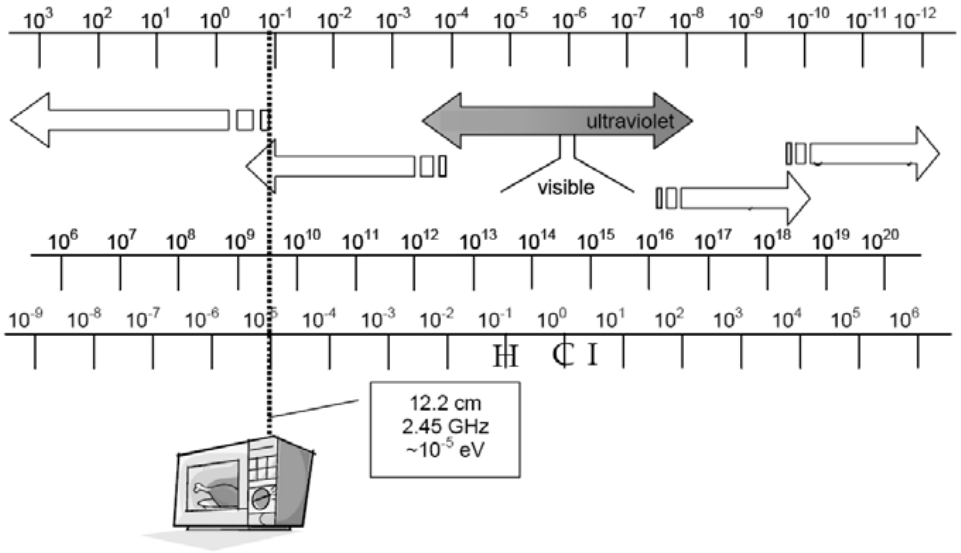



**Figure. 29** Spectre électromagnétique **(Kingston et Haswell, 1997).**

Les fréquences utilisables par les applications industrielles des micro-ondes sont réglementées pour éviter le risque d'interférence avec la radiocommunication et les radars, qui sont les principales utilisations des micro-ondes. La fréquence de 2,45 GHz ($\lambda$ = 12,2 cm) est généralement utilisée. Le transfert de chaleur par micro-ondes représente une propriété intéressante et est donc utilisé dans le domaine de l'extraction des huiles essentielles. En effet, contrairement à un chauffage classique, c'est le produit traité qui est la source de chaleur. Le dégagement de chaleur

s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur, tout le contraire d'un chauffage classique. Il n'est alors plus nécessaire de faire chauffer le récipient. Le matériel végétal est chauffé de manière directe. Cela est rendu possible par la rotation dipolaire. Le champ magnétique haute fréquence (2,45 GHz) appliqué dans le four micro-ondes permet un échauffement, un frottement entre les dipôles, qui conduit ensuite à un dégagement de chaleur.

#### 2.5.5.1. Extraction par solvant assistée par micro-ondes

La méthode d'extraction par solvant assistée par micro-ondes a été mise au point par l'équipe canadienne de **Paré *et al*. (1990).** Celle-ci a déposé le premier brevet européen sur « l'extraction de produits naturels assistée par micro-ondes ». Ces auteurs proposaient de traiter sous micro-ondes un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant partiellement ou totalement transparent aux micro-ondes qui permettent d'accélérer la cinétique d'extraction et de réduire le ratio solvant/charge.

Des essais effectués par cette nouvelle technique - notamment sur la menthe -, ont souligné le gain de temps ainsi que la similutide de la qualité des produits à ceux obtenus par  entraînement à la vapeur classique. De nombreux brevets seront déposés alors par Paré et son équipe tant au niveau américain qu'au niveau européen **(Paré *et al*., 1990 ; Paré *et al*., 1991 ; Paré, 1994)**. Le procédé original sera par la suite quelque peu modifié et enrichi et sera dénommé : MAPTM (Microwave Assisted Process). Il a pour vocation d'être une méthode d'extraction utilisable pour un grand nombre de matrices solides ou liquides telles que les végétaux mais aussi les tissus animaux, les sols, les cosmétiques ou les eaux polluées. Actuellement l'extraction assistée par micro-ondes (MAE : Microwave Assisted Extraction) est actuellement très généralement citée dans la littérature (Eskilsson et Bjorklund, 2000). En réalité, la MAE et MAPTM sont toutes deux des techniques d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. A titre d'exemple, un pilote d'extraction des épices et aromates par la technique MAPTM est présenté dans la **Figure 30**.

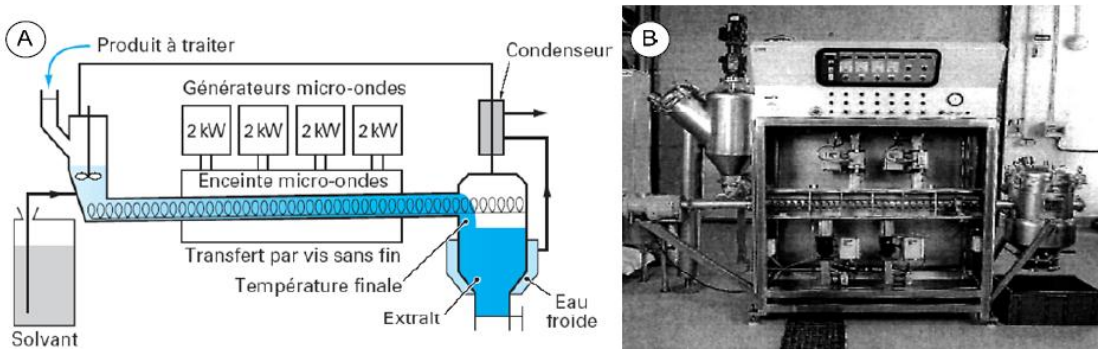



**Figure. 30** Schéma du procédé d'extraction MAPTM en continu (A) et photo d'une unité pilote du même procédé (B) **(Eskilsson et Bjorklund, 2000).**

### 2.5.5.2. Entraînement à l'air assisté par micro-ondes

En **1989**, **Craveiro *et al***. ont proposé une technique originale d'extraction de l'huile essentielle de Lippia sidoides par chauffage micro-ondes sans solvant en utilisant un compresseur à air. L'huile essentielle extraite en 5 minutes sous chauffage microondes était présentée comme qualitativement identique à celle obtenue en 90 minutes par entraînement à la vapeur. Le système proposé est inspiré du procédé d'entraînement à la vapeur d'eau classique. Il se compose en fait de trois parties : un compresseur envoyant de l'air dans le ballon où se trouve la matière végétale placée dans un four micro-ondes domestique, comme le montre la **Figure 31**.

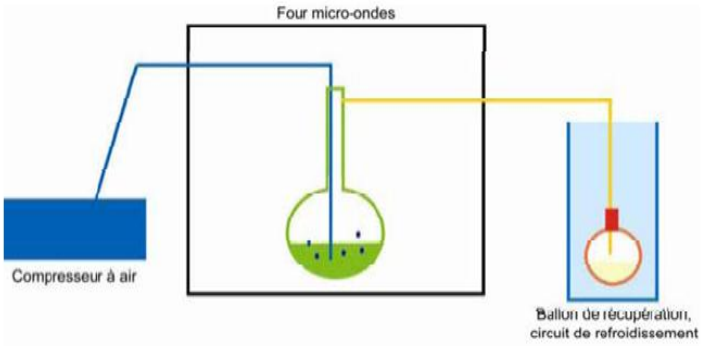



**Figure.31** Schéma du procédé d'extraction par entrainement à l'air assisté par micro-ondes **(Craveiro *et al*., 1989).**

### 2.5.5.3. Hydrodistillation par micro-ondes sous pression réduite

Le procédé « VMHD » ou Vacuum Microwave HydroDistillation a été élaboré et breveté par la société **Archimex** dans les années **1990**, avant d'être racheté par l'équipementier Pierre Guérin **(Mengal et Monpon, 1994)**. Cette technique

d'extraction, dont l'origine est l'hydrodistillation classique, est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. Le matériel végétal traité, frais ou sec (auquel cas on lui rajoute la quantité d'eau equise) est soumis d'une part aux micro-ondes dont le rôle est d'assurer le transfert de matière, puis d'autre part à un vide pulsé qui permet l'entraînement azéotropique des substances volatiles à une température inférieure à 100°C. Cette opération peut être répétée plusieurs fois selon le rendement souhaité. D'après les concepteurs du VMHD **(Figure 32),** l'extraction serait, pour un rendement équivalent et un extrait de composition identique, dix fois plus rapide que l'hydrodistillation. Les notes « crues », les plus thermosensibles, semblent être conservées après une extraction par VMHD contrairement à une hydrodistillation classique **(Toursel, 1997 ;Mengal *et al*., 1993).**

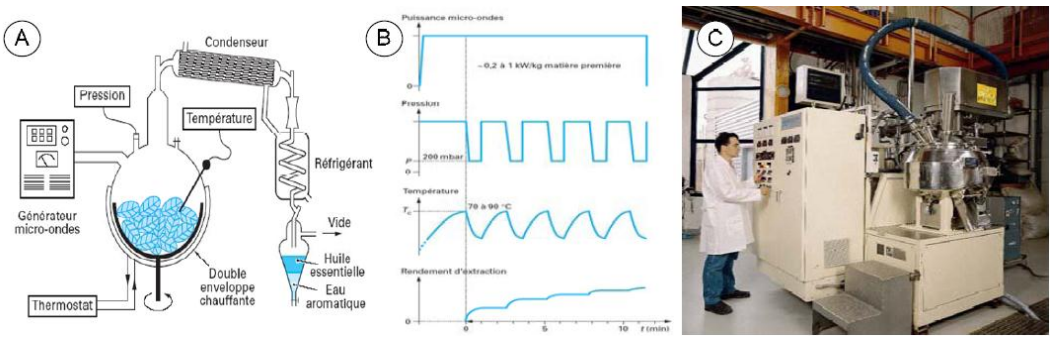



**Figure. 32** Schéma du procédé VMHD (A), Evolution des principaux paramètres (B), Photo d'une unité pilote du procédé VMHD (C) **(Toursel, 1997 ;Mengal *et al*., 1993).**

Récemment, **Stashenko *et al*. (2004)**, utilisent un procédé d'hydrodistillation par microondes.

Ce procédé basé entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique consiste à placer une partie du montage d'hydrodistillation dans le four à micro-ondes **(Figure 33).** Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités par ces auteurs sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique.

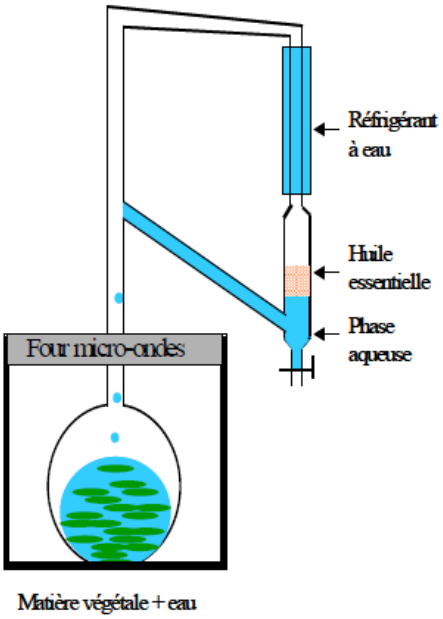



**Figure. 33** Schéma de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes **(Stashenko *et al*.,2004).**

### 2.5.6. Procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM)

En 2004, une méthode originale d'extraction des produits naturels assistée par microondes à pression atmosphérique, sans solvant et sans eau a été développée et brevetée par **Chemat *et al*. (2004).** Basée sur un principe relativement simple, cette méthode décrit une distillation sèche assistée par micro-ondes qui consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante permet la rupture des glandes contenant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite à partir de l'eau de la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation de façon continue du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, et le retour de l'excès d'eau à l'intérieur du ballon afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal (Figure 34). La distillation sèche assistée par micro-ondes, a été appliquée à deux types de plantes, les épices et les herbes aromatiques **(Lucchesi *et al*., 2004).**

Pour les plantes aromatiques, après seulement 30 minutes d'extraction les rendements en huiles essentielles obtenus par ESSAM (Extraction Sans Solvant Assistée par

Micro-ondes) sont identiques à ceux obtenus après 6 heures d'hydrodistillation. D'un point de vue qualitatif, on retrouve dans les huiles essentielles obtenues par ESSAM une proportion plus importante de composés oxygénés, les plus valorisables sur le plan olfactif.

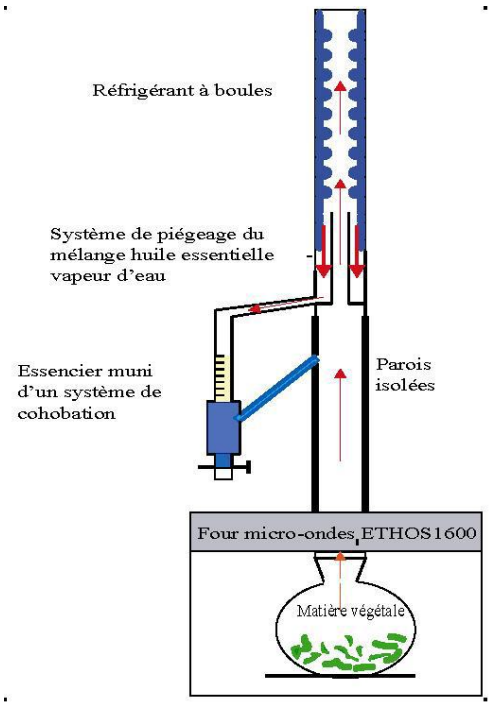



**Figure. 34** Schéma du procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-ondevs (ESSAM).

## 3. Huiles essentielles comme agents antimicrobiens

### 3.1. Généralités

Depuis l'Antiquité, les extraits aromatiques des plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme pour les médicaments et la parfumerie **(Heath, 1981)**. Les huiles essentielles ont été considérées comme les agents antimicrobiens les plus efficaces présents dans ces plantes.

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ième siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction des huiles essentielles contenue dans les plantes. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums.

Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle, a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances **(Essawi *et al.*, 2000)**. Depuis deux décennies, des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans le domaine alimentaire.

Les effets antimicrobiens de différentes espèces d'herbes et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ainsi, les huiles essentielles, actuellement employés comme arômes alimentaires sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés "généralement reconnus comme sains" (Generally Recognized As Safe GRAS), ou approuvés comme additifs alimentaires par la Food and Drug Administration. Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments ; cependant, des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne.

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. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulierde la nature de leurs composés volatils majeurs **(Sipailiene *et al.*, 2006)**. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycéliums alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures **(El Kalamouni, 2010).**

### 3.2. Mode d'action contre les bactéries

L'activité antimicrobienne des HE a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces HE. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HE. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à

cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action **(El Kalamouni, 2010).**

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

* attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.

* acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.

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

## 4. Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations. A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne in vitro d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide **(El Kalamouni, 2010).**

### 4.1. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque)

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture ensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque de l'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai.

Généralement, plus la zone d'inhibition est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible.

La mesure manuelle des zones d'inhibition peut prendre du temps. Les dispositifs automatisés avec zone de lecture sont disponibles et peuvent être intégrés avec le rapport de laboratoire et les systèmes de manipulation de données. Les disques devraient être distribués également de sorte que les zones d'inhibition autour des

disques antimicrobiens dans l'essai de diffusion en disque ne se chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée.

Généralement cela peut être effectué si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépende de la concentration du disque et de la capacité de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose **(El Kalamouni, 2010).**

### 4.2. Technique en milieu liquide (méthode de dilution)

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg/mL ou mg/litre). Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue. La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la concentration inférieure immédiate **(El Kalamouni, 2010).**

#### 4.2.1. La dilution en bouillon

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution). L'utilisation de ces plaques avec un protocole documenté, y compris les précisions sur les micro-organismes de référence approprié, peut faciliter la comparaison des résultats entre analyses **(El Kalamouni, 2010).**

#### 4.2.2. La dilution en gélose

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte **(El Kalamouni, 2010)**.

### 4.3. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)

Les huiles essentielles récupérées par les trois procédés ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse seule **(Tableau 2)** sur un appareil de marque

HewlettPackard 6890 et par couplage de celui-ci à la spectrométrie de masse (appareil Hewlett Packard 5973A) **(Tableau 3) (Bousbia, 2011).**

Deux colonnes capillaires, l'une polaire (Stabilwax) et l'autre apolaire (HP5 MS), ont été utilisées afin d'obtenir des informations satisfaisantes sur la composition des HE, puisque **Sebastiani *et al*. (1983)**, ont démontré qu'avec une phase stationaire apolaire (de type polyméthylsiloxane) des chevauchements partiels ou complets des pics ont été observés entre l'octanal et l'α-phéllandrène, le 1,8-cinéole et le limonène, le nérol et le citronellol ; avec les phases polaires (de type polyéthylèneglycol) une co-élution été observée entre certains alcools monoterpéniques, esters et hydrocarbures sesquiterpéniques.

**Tableau 2 :** Conditions opératoires des analyses par chromatographie en phase gazeuse **(Bousbia; 2011).**

| Colonne capillaire | HP5 MS | Stabilwax |
|---|---|---|
| **Longueur** | 30 m | 60 m |
| **Diamètre interne** | 0,25 mm | 0,25 mm |
| **Epaisseur de phase** | 0,25 µm | 0,25 µm |
| **Température du détecteur (FID)** | 320°C | 320°C |
| **Gaz vecteur** | Azote | Azote |
| **Débit** | 1,0 mL/min | 1,0 mL/min |
| **Température de l'injecteur** | 250°C | 250°C |
| **Programmation du four** | 2°C/min de 60°C à 280°C | 2°C/min de 60°C à 280°C |
| | 8 min à 60°C | 8 min à 60°C |
| | 15 min à 280°C | 15 min à 280°C |
| **Concentration des échantillons** | pur | pur |
| **Quantité injectée** | 1 µL | 1 µL |
| **Mode d'injection** | Split 1 :20 | Split 1 :20 |

**Tableau 3 :** Conditions opératoires des analyses par CG/SM **(Bousbia, 2011).**

| Colonne capillaire | HP5 MS | Stabilwax |
|---|---|---|
| **Mode de détection** | Impact électronique | Impact électronique |
| **Courant d'ionisation** | 70 eV | 70 eV |
| **Longueur** | 30 m | 60 m |
| **Diamètre interne** | 0,25 mm | 0,25 mm |
| **Epaisseur de phase** | 0,25 µm | 0,25 µm |
| **Température du détecteur (FID)** | 320°C | 320°C |
| **Gaz vecteur** | Hélium | Hélium |
| **Débit** | 0,7 mL/min | 0,3 mL/min |
| **Pression en tête de colonne** | 10-7 mbar | 10-7 mbar |
| **Pression (source, analyseur)** | | |
| **Température d'interface** | 280°C | 280°C |
| **Température de l'injecteur** | 250°C | 250°C |
| **Programmation du four** | 2°C/min de 60°C à 280°C | 2°C/min de 60°C à 280°C |
| | 8 min à 60°C | 8 min à 60°C |
| | 15 min à 280°C | 15 min à 280°C |
| **Concentration des échantillons** | pur | pur |
| **Quantité injectée** | 1 µL | 1 µL |
| **Mode d'injection** | Split 1 :20 | Split 1 :20 |

L'identification des constituants de l'huile essentielle se fait par comparaison du spectrede masse de chaque pic séparé par CG avec ceux reportés comme références dans des librairies spécialisées de spectrométrie de masse.

La fiabilité de la reconnaissance est principalement, donnée par un taux de vraisemblance (supérieur à 90 %) du spectre de masse du soluté inconnu par rapport à celui de la banque de
données. Cette présence est confirmée par le calcul des indices de rétention propres à cecomposant. **(Bousbia ; 2011)**

L'indice de rétention d'un soluté donné peut être obtenu à partir d'un chromatogrammecomplexe de solutés en mélange et d'au moins deux alcanes normaux qui encadrent le solutéd'intérêt. Ceci revient à considérer les alcanes comme des étalons sur lesquels l'échelle desindices de rétention se réfère.
Par définition, l'indice de rétention d'un alcane normal est égal à 100 fois le nombre d'atomes de carbones présents dans le composé indépendamment du remplissage de la colonne, de la température et des autres conditions chromatographiques. Les indices de rétention de tous les composés autres que les alcanes normaux varient souvent de plusieurs centaines d'unités avec les paramètres de la colonne **(Skoog *et al*., 2003).**
Le système des indices de rétention de Kovàts, est d'un usage général, a dépassé largement le cadre de l'analyse qualitative pure et simple. Il est utilisé pour caractériser les
phases stationnaires **(Tranchant *et al*., 1995).** Dans les conditions de montée linéaire de la
température de la colonne, **Van Den Dool et Kratz (1963),** ont donc proposé la formule suivante de calcul des indices :

$$\text{IR} = 100x\frac{(t_R)_i-(t_R)_n}{(t_R)_{n+1}-(t_R)_n} + 100n$$

Où :
IR : Indice de rétention du soluté considéré ;
$(t_R)_i$: Temps de rétention du soluté considéré ;
$(t_R)_n$: Temps de rétention de l'alcane contenant "n" atomes de carbone et dont le pic précède celui du soluté ;
$(t_R)_{n+1}$ : Temps de rétention de l'alcane contenant "n+1" atomes de carbone et dont le pic
sort après celui du soluté ;
n et n+1: nombre de carbones des hydrocarbures paraffiniques (n-alcanes) ;

La préparation de la solution étalon des n-alcanes pour la mesure des indices de Kovats des composés identifiés dans les huiles essentielles a été faite comme suit : Solution des nalcanes de C8 à C26 (origine: Aldrich et Fluka Chemicals) à 5% dans le pentane. Soit 0,1 g de chaque alcane dans 20 mL de pentane, conservé au réfrigérateur. L'identification des composés a été effectuée par comparaison de leurs indices de rétention (indices de Kovats) et des spectres de masse expérimentaux de leurs ions-fragments caractéristiques à ceux cités dans la littérature**(Adams, 2007)** et/ou inventoriés dans les banques de librairies spectrales (Wiley 7, Nist 002).

### 4.4. Analyse par HPLC

Les analyses par HPLC sont effectuées en utilisant un chromatographe liquide de marque Waters (Milford, MA). Le système HPLC est équipé d'une pompe Waters 600E, d'un auto-injecteur Waters 717, d'un détecteur à barrette diodes. La pompe, l'auto-injecteur, la température de la colonne et le système à barrette de diodes sont contrôlés par le logiciel Waters Empower 2. Les longueurs d'ondes utilisées sont de 284 et 329 nm pour la quantification des polyphénols du romarin. La séparation chromatographique s'effectue avec une colonne Purospher Star RP-18 (250 x 4 mm D.I. ; dont la dimension des particules est de 5 µm (VWR)), et est munie d'une pré-colonne RP-18 (4 x 4 mm D.I.). La colonne et la pré-colonne sont toutes deux maintenues à la température de 37°C. La phase mobile dont le débit est de l'ordre de 1 mL /min, est constituée de deux solvants : solution aqueuse (pour hplc) contenant 0,5 % acide acétique (Solvant A) et 100 % d'acétonitrile (Solvant B). La programmation des solvants est la suivante **(Tableau 4) (Bousbia, 2011).**

**Tableau 4 :** Programmation des taux de solvants utilisés au cours de l'analyse par HPLC **(Bousbia, 2011).**

| Temps (min) | Solvant A (%) | Solvant B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 90 | 10 |
| 20 | 70 | 30 |
| 25 | 65 | 35 |
| 30 | 65 | 35 |
| 35 | 90 | 10 |

Le volume d'échantillon injecté est de l'ordre de 20 µL. Les analyses sont tri-répliquées et lamoyenne seule est reportée. La quantification est effectuée en injectant des standards externes et les concentrations finales sont exprimées en mg/ 100 g **(Bousbia, 2011).**

### 4.5. Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité de la matière végétale a été déterminé par la méthode de Dean et Stark ou par la méthode physique en introduisant 10 g broyés d'échantillon et placés dans une coupelle tarée, elle-même positionnée dans une étuve réglée à 103° ± 2°C. Les échantillons sont ensuite pesés avec précision toutes les vingt-quatre heures, après avoir été refroidis à température ambiante dans un dessiccateur, et ce jusqu'à obtention d'un poids constant **(Bousbia, 2011).**

### 4.6. Rendement en huile essentielle $Rdt_{\mathrm{HE}}$

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport des masses de l'huile essentielle et de la matière végétale séchée. Il est exprimé en pour cent (%) **(Bousbia, 2011).**

$$\boldsymbol{Rdt}_{\mathbf{HE}} = \frac{M_{HE}}{\mathrm{MVS}} x\ 100$$

Où :

$\boldsymbol{Rdt}_{\mathbf{HE}}$ : Rendement en huile essentielle (%) ;

$M_{HE}$: Masse de l'huile essentielle (g) ;

MVS : Masse de la matière végétale sèche (g).

### 4.7. Mesure de la densité selon la norme NF T 75-111

Elle est effectuée à l'aide d'un pycnomètre d'un millilitre de volume, à la température de 20°C **(Bousbia, 2011).**

### 4.8. Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T 75-112

Elle est effectuée à l'aide d'un réfractomètre de type Bellinghame permettant avec une précision de ± 0,0002, la lecture directe des indices de réfraction situés entre 1,3000 et 1,7000 **(Bousbia, 2011).**

**Mode opératoire :**

- Régler le réfractomètre en mesurant les indices de réfraction des produits étalons (eau distillée, d'indice de réfraction 1,3330 à 20 °C) ;
- Vérifier que le réfractomètre est maintenu à la température à laquelle les lectures doivent être effectuées, la température de référence étant de 20 °C ;
- Placer l'échantillon pour essai dans le réfractomètre, attendre que la température soit stable, puis effectuer la mesure **(Bousbia, 2011).**

### 4.9. Mesure du pouvoir rotatoire : NF T 75-113

Elle est obtenue à l'aide d'un polarimètre de type JASCO 1010 (réglé de façon à donner 0° et180° avec l'eau).
- Source lumineuse (lampe à vapeur de sodium), permettant d'obtenir une lumière delongueur d'onde 589,3 ± 0,3 nm.
- Tube d'observation de 100 ± 0,5 mm de longueur.

**Mode opératoire :**

- Dilution de l'essence d'écorces d'agrumes : 0,25g/ 100 mL d'éthanol.

- Remplir le tube avec l'échantillon pour essai, en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée.
- Placer le tube dans le polarimètre et lire l'angle de rotation de l'échantillon pour essai sur l'échelle de l'appareil **(Bousbia, 2011).**

### 4.10. Analyse en Microscopie Electronique à Balayage

Les échantillons végétaux, recueillis après extraction de l'HE, selon les procédés HD et MHG ont été examinés à l'INRA d'Avignon, Unité de pathologie végétale (France) à l'aide d'un Microscope Electronique à Balayage de marque Philips XL30.
Les échantillons ont été fixés sur un dispositif métallique, traités à l'azote liquide et coupés au scalpel. Ils ont été ensuite métallisés avec de l'or dans un appareil de pulvérisation de type Balzers SCD 004 pour obtenir une couche de l'ordre de 10 nm. L'observation des échantillons se fait sous vide avec une accélération du voltage de 10kV et en manœuvrant à une distance de l'ordre de 15 mm **(Bousbia, 2011).**

## 5. Mesure de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Nous avons appliqué la technique par contact direct de l'aromatogramme pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Ce test a été effectué suivant la méthode de **Conner et Beuchat (1984), Adam *et al*. (1998) et Chao *et al*. (2000)** et en respectant les recommandations établies par le BSAC (British Society for

Antimicrobial Chemotherapy) et développées par **Andrews (2001).**

Ce test est effectué par dépôt d'un disque stérile de cellulose de 9 mm de diamètre (Whatman N°1) imprégné d'une quantité d'HE sur un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture microbienne. Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (Figure 35).

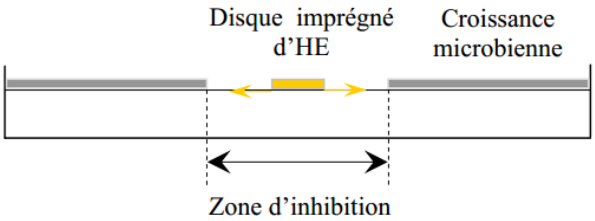



**Figure. 35** Aromatogramme sur boite de Pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle **(Andrews, 2001).**

## 6. Généralité sur le plant

### 6.1. Taxonomie

**Tableau 5** : Taxonomie de *Thymus Capitatus (L.) Hoffmanns. & Link*

| | |
|---|---|
| **Embranchement** | ***Tracheophyta – vascular plants, tracheophytes*** |
| **Sous embranchement** | *Spermatophytina – spermatophytes, seed plants, phanérogames* |
| **Classe** | *Magnoliopsida* |
| **Sous classe** | *Asteranae* |
| **Ordre** | *Lamiales* |
| **Famille** | *Lamiaceae – mints, menthes* |
| **Genre** | *Thymus L. – thyme* |
| **Espèce** | *Thymus capitatus (L.) Hoffmanns. & Link* |

### 6.2. Description de la Genre

Selon les plantes aromatique de la famille de de Lamiaceae, le genre Thymus est remarquable pour ses nombreuse espèces sauvages et ses plantes cultivables. Divisé on huit sections, comprises entre 250 espèces **(Mabberley ,1997)**, et à peu près 110 d'entre elles poussent dans le bassin méditerranéen. Le nombre varie selon le point de vue taxonomique **(Morales ,1997)**.

Jusqu'à ce jour il y a plusieurs défis pour élaborer la taxonomie des espèces de ce genre à cause de sa grande variation de population, malgré il y a plusieurs donnée en morphologie, micromorphologie, composition chimique et produits du métabolisme seconder **(Stahl-BiskupetSaez ,2002)**.

Plusieurs explications existent concernant l'origine du nom Thymus, quelques auteurs supposent que le nom latin Thymus vient de nom grec thyo (parfum). D'autre interprétation de son étymologie considèrent le nom grec thymos (courage, pouvoir).

Les deux noms se réfèrent à la principale faculté de ce genre, la présence de glandulaire trichome, des petites usines des huiles essentielles que laissent ses plantes

comme étant l'une des plus utilisées dans le domaine culinaire et médicinal à travers le monde entier.

Ses huiles essentielles sont des produit de grande demande dans la fabrication des parfums et cosmétiques et aussi pour des utilisations médicinales (Lawrence ,1992).

La composition chimique des huiles essentielles des espèces de thymus sont variées à cause de diffèrent facteur intrinsèque (variation génétique) et extrinsèque (aspects écologiques et environnementales) **(Stahl-Biskup et Saez ,2002)**. Les facteurs environnementaux comme la température, radiation et photopériode et les matériaux nutritifs qui sont important au développement de la plante (eau, minéraux et nitrogènes) jouent un rôle important dans la quantité et qualité des huiles essentielles.

### 6.3. *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link

Arbrisseau rigide; feuilles linéaires ou linéaires-lancéolées ciliolées; inflorescences, à dents serrées les unes contre les autres.

C'est une espèce du bassin méditerranéen, dans le bioclimat tempéré et se développe dans l'étage de végétation thermo-méditerranéen toujours en mélange avec le Chamaerops humilis **(Jahandiez et Maire, 1934 ; Benabid, 2000)**

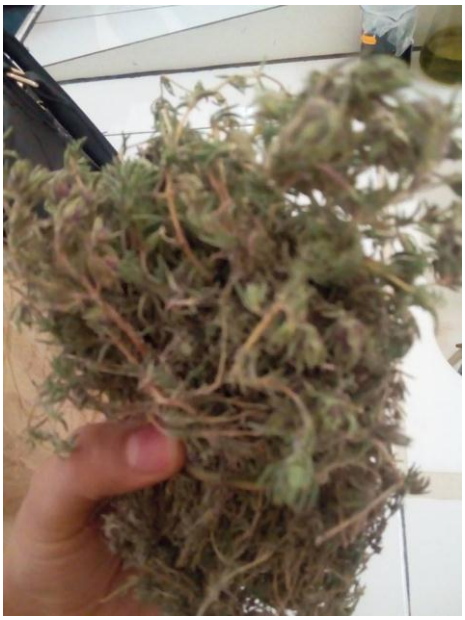


**Figure. 36** *Thymus capitatus (L.) Hoffmanns. & Link.***(Original, 2017).**

# Partie
# Pratique

# 1. Matériels et produits :

## 1.1. Vererie :

- Ampoules à décanter 500ml.
- Ballons de 500ml et 1000ml.
- Bécher 1000ml.
- Entonnoir.
- Eprouvettes graduées.
- Erlenmeyer de 1000et 250ml.
- Pipettes pasteur.
- Tubes à vis.
- Verre de montre.

## 1.2. Produits chimiques :

- Eau distillée.
- Eau physiologique.
- Ether diéthylique.
- MgSO4.
- Solution Macfarland.

## 1.3. Appareils :

- Agitateur magnétique.
- Autoclave.
- Balance.
- Etuve.
- Evaporateur rotatif.
- Hotte.
- Hydrodistillateur.
- Spectrophotomètre.
- Vortex.

### 1.4. Autres :

- Barreaux magnétiques.
- Bec bunsen.
- Boites Pétri.
- Cuvettes.
- Ecouvillons.
- Papier filtre er disques en papier filtre.
- Pince.
- Portoirs.
- Seringues (5 et 10ml).
- Spatules.
- Le milieu utilisé est le MH (Muller Hinton).
- Billion Nutritif BHIB

### 1.5. Les souches :

- Bacillus cereus.
- Enterococcus fecalaes.
- Escherichia coli.
- Klebsiella pneumonae.
- Micrococcus leteus.
- Salmonella enterica.
- Salmonella typhii.
- Staphylococcus aureus.

## 2. Procédé d'extraction :

### 2.1. Préparation de l'échantillon

La récolte a été faite pendant le printemps. On a récolté 03 touffes de *Thymus capitatus* pour chaque région celle de Bahrara et Djebel Omran

En Premier, le partie aérienne de l'échantillon de la plante thymus capititus de a région de Djebel Omran et Bahrara a été mis dans un tissu de coton, et puis accroché à l'air libre dans un endroit ensoleillé pendant une semaine.

### 2.2. Hydrodistillation

En premier lieu la plante est découpée en petits morceaux afin de pouvoir introduire 50g de matière végétale dans un ballon de 1 litre à fond round, puis on y ajoute un volume de 650 ml d'eau distillée, après avoir agité l'ensemble, le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon l'hydro-distillation se fait pendent 2.5 à 4 heures **(Kheyar, 2014).**

**Figure. 37** Pesée de la plante **(Original, 2017).**

La vapeur d'eau entraine les molécules volatiles qui se condensent dans un réfrigérant et le mélange eau-huile est recueilli dans un Erlenmeyer.

L'opération a été répétée 03 fois pour la plante pour chaque région (Bahrara et Djebel Omran).

**Figure. 38** L'Hydrodistillation **(Original, 2017).**

### 2.3. Extraction liquide-liquide

Cette méthode permet la séparation de l'huile essentielle de l'eau distillée par l'addition d'un solvant dans lequel l'huile essentielle se dissout mieux, en se basant sur la différence d'affinité entre la phase organique et la phase aqueuse.

A l'aide d'une éprouvette graduée on mesure 200ml de distillat, qu'on l'introduit ensuit dans une ampoule à décanter de 500ml auquel on ajoute une quantité de 100ml d'éther diéthylique. On ferme l'ampoule, on agite énergétiquement et on dégaze après chaque agitation, pour éviter une surpression dans l'ampoule. On fixe l'ampoule à décanter sur un support et on laisse le mélange se reposer jusqu'on remarque la formation de deux phases liquides non miscibles, une phase supérieure qui est l'éther déthylique et une phase inferieure qui est le distillat, ensuit si les 2 phases soient bien distinctes l'une de l'autre, on débouche l'ampoule et on récupère chaque phase dans un récipient (ballon 500ml). On répète l'opération pour la quantité totale de distillat obtenu.

La phase organique récupérée contient quelques gouttes d'eau qui doivent être éliminées par l'addition de sulfate de magnésium anhydre ($MgSO_4$), puis laisser agir sur un agitateur

magnétique pendant 15 min avant de filtrer. Après la filtration de la phase organique, on obtient un mélange composé de l'huile essentielle avec le solvant. **(Khalifa et Benmechih, 2012)**

**Figure. 39** Séparation liquide-liquide **(Original, 2017).**

### 2.4. Elimination du solvant

La phase organique contenant l'huile essentielle est transvasée dans un ballon de 500ml qui est branché à l'évaporateur rotatif. La température est réglée à 35°C (température d'ébullition de l'éther diéthylique), après 30 min l'éther diéthylique s'évapore et se condense dans un deuxième ballon de l'autre côté de l'appareil et l'huile essentielle reste dans le ballon initial.

L'huile essentielle ainsi obtenue est transvasée dans un tube, le tube après avoir été enroulé dans du papier aluminium (protection de la lumière) est conservé au frais.

**Figure. 40** L'évaporateur rotatif **(Original, 2017).**

**Figure. 41** Les huiles essentielles obtenues **(Original, 2017).**

## 3. Etude de l'activité antibactérienne

### 3.1. Choix des milieux de culture

Suivant les méthodes employées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisé comme milieux de culture solide: Muller Hinton (MH): C'est le milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne parce que c'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens **(Gachkar *et al*.,2006).**

Ce milieu est préparé selon la méthode suivante : on pèse avec précision une quantité de poudre déshydratée du MH équivalente 38 g dans un ballon en y ajoutant 1000 ml d'eau distillée. Le mélange de la poudre-eau distillée est chauffé sur plaque chauffante avec agitation à l'aide d'un barreau magnétique pendant 20 min afin d'assurer une bonne dissolution des cristaux. Le milieu MH est ensuite réparti dans des flacons stériles avant d'être autoclavé pendant 15 min à 121°C avec une pression de 1 bar.

Boillon cœur-cervelle (BHIB): C'est le milieu d'enrichissement pour toutes les souches bactériennes **(Benkeblia, 2004)**.Il est utilisé pour la réification des souches avant chaque essai avec incubation dans l'étuve pendant 18h à 37°C.

### 3.2. Repiquage

Cette étape permet l'obtention d'une culture pure et jeune des bactéries à tester.

A l'aide d'une lance de platine (après flambage) on prélève des colonies de la bactérie qui seront ensemencées sur une gélose Muller Hinton (MH) préalablement coulé dans des boites de pétri et refroidies, après 18h d'incubation à 37°C on obtient des bactéries jeunes pour la préparation des inocula.

### 3.3. Préparation des suspensions

À partir des cultures jeunes des bactéries ressorties après 18h, on prélève des colonies par une pipette Pasteur, puis on les transfert dans des tubes à vice contenant 5ml d'eau physiologique, le mélange eau physiologique-bactérie est homogénéisé à l'aide d'un vortex et on mesure leur densité optique par le spectrophotomètre après son étalonnage par le Mac Farland 0.5, une cuve contenant l'inoculum est placée dans l'appareil, la densité optique doit être comprise entre 0.08 et 0.1 à une longueur d'onde de 625 nm, l'ajustement de cette densité se fait par l'addition d'eau physiologique si la solution est trop chargée ou de culture si elle est trop faible. **(Mokhtari, 2014).**

**Figure. 42** La mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre **(Original, 2017).**

### 3.4. Aromatogramme et Micro-atmosphère

C'est la méthode *in-vitro* choisit pour mesurer le pouvoir antibactérien des huiles essentielles.

**Protocole experimentale :**

On coule aseptiquement le milieu de culture gélosé Muller Hinton (M.H) en surfusion ; dans des boites de Pétri à raison de 15 ml par boite. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse.

On plonge un écouvillon stérile dans l'inoculum préalablement préparé, on l'essore doucement sur la paroi du tube, puis on ensemmence la boite de petri en passant l'écouvillion sous forme de stries sur la surface de la gélose et en tournant la boite 3 fois pour assurer une distribution complète de la bactérie**.( Khalifa et Benmechih, 2012)**

#### 3.4.1. L'aromatogramme :

Le dépôt des disques se fait à l'aide d'une prince stérile, on préleve un disque de papier filtre préalablement sérilisé par autoclavage, on l'imbibe avec l'huile essentielle (5µl) et on le dépose délicatement sur la surface gélosée, Les boites de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant quelques temps, et mises à l'étuve à la température de 37°C pendant 24h.

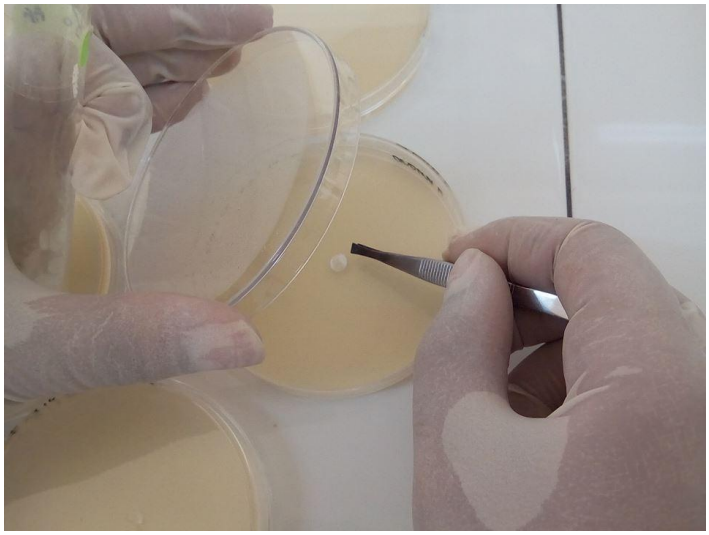


**Figure. 43** L'application de disque sur le MH **(Original, 2017).**

### 3.4.2. La micro-atmosphère

On prend les disques stérile sur le couvercle de la boite de pétri, et on l'imbibe ave 5µl de l'huile essentielle, et puis on ferme et laissées diffuser à température ambiante pendant quelques temps, et mises à l'étuve à la température de 37°C pendant 24h.

Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des HE, elle montre seulement l'activité des constituants volatiles à la température d'incubation

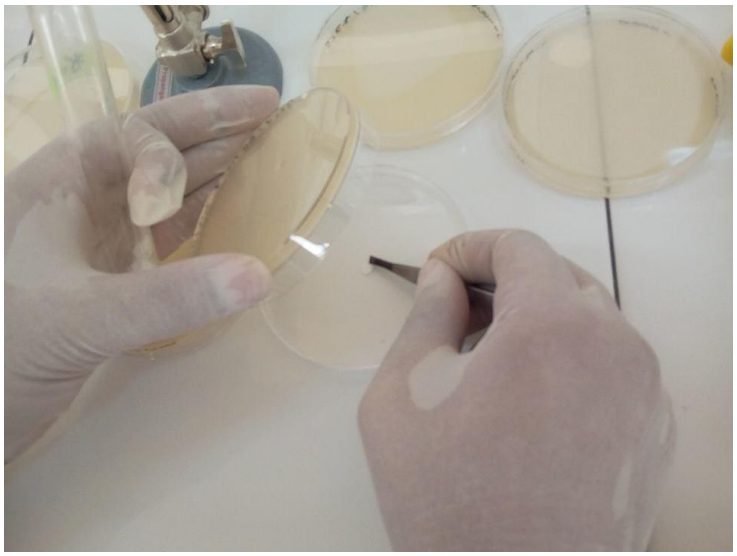


**Figure. 44** L'application de disque sur couvercle de la boite de Pétri **(Original, 2017).**

Toutes les manipulations ont été faites dans la zone stérile autour d'un bec Bunsen pour éviter toute sorte de contamination.

## 4. Chromatographie en phase gazeuse (CG) et chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG/SM)

La composition chimique des huiles essentielles a été déterminée par la technique de chromatographie en phase gazeuse (CG) et la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG/SM) sous les conditions opératoires suivantes :

- La détermination des pourcentages relatifs des constituants et la comparaison entre les différents chromatogrammes ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type Perkin Elmer couplé à la spectroscopie de masse et muni d'une colonne capillaire de 30 m de longueur, 0.25 mm de diamètre interne et 0.25 µm d'épaisseur de film. La température de la colonne est programmée de 60 °C à 220°C à raison 5°C /min et en isotherme (240°C) pendant 2min. Les températures de l'injecteur et le détecteur sont fixées à 270°C. Le débit du gaz vecteur (Hélium) est fixé à 1.8 mL/min.

# Résultats et discussion

## 1. Détermination de rendement d'huile essentielle

Le rendement en huile essentielle (R%) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M) **(Benyoussef *et al* ., 2002).**

Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$R(\%) = (M'/M)*100$$

M'**:** la masse d'huile essentielle après l'extraction.

M**:** la masse de la matière végétale utilisée.

**Tableau 6** : Les rendements des huiles essentielles de *Thymus capitatus* de deux régions (Djebel Omran et Bahrara, Djelfa).

| **Materiel vegetal *Thymus capitatus* de deux régions**: | **La masse d'huile essentielle(g)** | **Rendement (%)** |
|---|---|---|
| **Djebel Omran** | 0.4632 | 0.4632 |
| **Bahrara** | 0.617 | 0.4113 |

Le rendement de l'échantillon de *Thymus Capitatus* de la region de Bahrara est plus faible que le rendement de l'échantillon de *Thymus Capitatus* de la région de Djebel Omran, et les deux sont plus faibles que les autres espèces de *Thymus* (Tableau 6).

**Tableau 7** : Les rendements de quelques espèces de *Thymus* **(Dob *et al*., 2006 ; Moldao-Martins *et al*., 2002 ; Edward *et al*., 1987).**

| **Materiel végétale** | **Rendement (%)** |
|---|---|
| *Thymus capitatus* | 2.05% |
| *Thymus algeriensis de L'Agérie* | 1.13% |
| *Thymus zygisest* | 1.1% |
| *Thymus zygis* | 1.2% |
| *Thymus Bleicherianus* | 1.75% |
| *Thymus capitatus(*Djebel Omran) | 0.4632% |
| *Thymus capitatus(*Bahrara) | 0.4113% |

## 2. Résultats de l'antibiogramme et la micro-atmosphère:

Ce test est réalisé afin de déterminer la sensibilité des souches testées aux les huiles essentielles de la *Thymus capitatus* de la région de Bahrara et djebel Omran

**Tableau 8 :** Les diamètres des halos d'inhibition (mm) des souches testées

| Souche | Aromatogramme | | Micro-atmosphère | |
|---|---|---|---|---|
| | Bahrara | Djebel Omran | Bahrara | Djebel Omran |
| *Salmonella typhii* | 26.52 | 32.10 | 21.78 | 15.81 |
| *Enterococcus fecalaes* | 47.05 | 43.22 | 40.24 | 22.01 |
| *Escherichia coli* | 43.51 | 46.74 | 16.18 | 10.82 |
| *Klebsiella pneumonae* | 47.97 | 42.53 | 14.62 | 10.55 |
| *Salmonella enterica* | 38.32 | 57.14 | 13.52 | 13.56 |
| *Micrococcus leteus* | 37.39 | 60 | 0 | 20.93 |
| *Staphylococcus aureus* | 25.34 | 23 | 11.47 | 28.95 |
| *Bacillus cereus* | 44.07 | 52.22 | 10.7 | 8.65 |

D'après **Ponce *et al*. (2003)**, la sensibilité à l'huile a été classée par le diamètre des halos d'inhibition :

Non sensible (-) pour les diamètres moins de 8mm ;

Sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ;

Très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm ;

Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm.

**Tableau 9 :** les diamètres des halos d'inhibition des souches testées de L'aromatogramme et la micro-atmosphère

| Souche | Aromatogramme | | Micro-atmosphère | |
|---|---|---|---|---|
| | Bahrara | Djebel Omran | Bahrara | Djebel Omran |
| *Salmonella typhii* | +++ | +++ | +++ | ++ |
| *Enterococcus fecalaes* | +++ | +++ | +++ | +++ |
| *Escherichia coli* | +++ | +++ | ++ | + |
| *Klebsiella pneumonae* | +++ | +++ | + | + |
| *Salmonella enterica* | +++ | +++ | + | + |
| *Micrococcus leteus* | +++ | +++ | - | +++ |
| *Staphylococcus aureus* | +++ | +++ | + | +++ |
| *Bacillus cereus* | +++ | +++ | + | + |

On peut observer que le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Thymus capitatus* par application directe est très élevé, toutes les souches testées sont extrêmement sensibles.

*Salmonella typhii* est extrêmement sensible aux particules volatiles d'huile essentielle de *Thymus capitatus* de la région de Bahrara et très sensible aux particules volatile d'huile essentielle de *Thymus capitatus* de la région de Djebel Omran.

*Enterococcus fecalaes* est extrêmement sensible aux particules volatiles d'huile essentielle de *Thymus capitatus* des deux régions.

*Escherichia coli est* très sensible aux particules volatiles d'huile essentielle de *Thymus capitatus* de la région de Bahrara et sensible aux particules volatiles d'huile essentielle de *Thymus capitatus* de la région de Djebel Omran.

*Klebsiella pneumonae* est sensible aux particules volatiles d'huile essentielle de *Thymus capitatus* des deux régions.

*Salmonella enterica* est sensible aux particules volatiles d'huile essentielle de *Thymus capitatus* des deux régions.

*Micrococcus leteus* est non sensible aux particules volatiles d'huile essentielle de *Thymus capitatus* de la région de Bahrara. Et extrêmement sensible aux particules volatiles d'huile essentielle de *Thymus capitatus* de la région de Djebel Omran.

*Staphylococcus aureus est* extrêmement sensible aux particules volatiles d'huile essentielle de *Thymus capitatus* de la région de Djebel Omran. Et sensible aux particules volatiles d'huile essentielle de *Thymus capitatus* de la région de Bahrara.

*Bacillus cereus* est sensible aux particules volatiles d'huile essentielle de *Thymus capitatus*des deux régions.

Le plus grand halo d'inhibition causé par le plant de la région de Bahrara est 47.97 mm par L'aromatogramme sur les souches de *Klebsiella pneumonae*.

Le plus grand halo d'inhibition causé par le plant de la région de Djebel Omran est 57.14 mm par L'aromatogramme sur les souches de *Salmonella enterica*

**Table 10** représente une compilation de résultats déjà publiés dans l'activité antibactérienne des huiles essentielles de déférents espèces de thymus. Pour compare l'activité avec la composition chimique, Ici sont présentés seulement les données en mm pour les halos d'inhibition de l'activité antibactérienne

**Tableau 10** : l'activité antibactérienne de déférentes espèces de thymus.

| L'espèce de thymus | Chemotype (content %) | Souches | halos d'inhibition (mm) | Références |
|---|---|---|---|---|
| ***T. longicaulis*** | Carvacrol (60.8) | *Escherichia coli*<br>*Salmonella enteritidis*<br>*Staphylococcus aureus*<br>*Bacillus cereus* | 23.2<br>24.3<br>31.4<br>21.6 | Chorianopoulo *et al.* (2004) |
| | Geraniol (27.4) | *Escherichia coli*<br>*Salmonella enteritidis*<br>*Staphylococcus aureus*<br>*Bacillus cereus* | 14.7<br>10.8<br>11.4<br>11.4 | Chorianopoulo *et al.* (2004) |
| | Thymol (46.3) | *Staphylococcus aureus* | 35.0 | Vladimir-Knez ˇevic *et al.* (2012) |
| ***T. pannonicus*** | Geranial (41.4) | *Staphylococcus aureus*<br>*Enterococcus faecalis*<br>*Escherichia coli*<br>*Klebsiella pneumoniae* | 16.8<br>14.5<br>12.0<br>22.8 | Maksimovic *et al.* (2008) |
| ***T. vulgaris*** | Thymol (47.9) | *Escherichia coli*<br>*Salmonella typhii*<br>*Salmonella enteritidis*<br>*Staphylococcus aureus*<br>*Staphylococcus epidermidis* | 29.4<br>28.2<br>35.4<br>26.2<br>48.0 | Bozin *et al.* (2006) |
| | Thymol (43.4) | *Staphylococcus aureus*<br>*Enteroccocus faecalis*<br>*Escherichia coli* | 27.0<br>11.0<br>16.0 | Hoferl *et al.* (2009) |
| | Thymol (48.9) | *Staphylococcus aureus*<br>*Salmonella enteritidis*<br>*Salmonella typhimurium*<br>*Escherichia coli* | 28.0<br>24.0<br>20.0<br>22.0 | Sokovic *et al.* 2010 |

## 3. Détermination de les compositions majoritaires du plant par Chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG/SM)

L'indentification est gratifiée grâce aux logiciels informatiques gérant les banques de données spectrales de composés organiques, **Wiley11** et **NIST14**.

### 3.1. Bahrara

**Produits majoritaires:** α-terpineol acetate et L-camphor

### 3.2. Djebel Omran

**Produit majoritaire:** α-terpineol acetate

**Tableau 11 :** Chemotypes des Huiles essentielles des espèces de thymus

| Espèce de Thymus | Provence | Chemotype (content %) | Produits majoritaires | Références |
|---|---|---|---|---|
| ***T. albanus ssp. albanus*** | Macedonia | (E)-Nerolidol (20.3)<br>(E)-Nerolidol (48.4) | (*E*)-Nerolidol, β-caryophyllene, geraniol<br>(*E*)-Nerolidol, β-caryophyllene, geranyl acetate | Kulevanova *et al*. (1998d) |
| ***T. alsarensis*** | Macedonia | Carvacrol (33.0)<br>Linalool (27.6) | Carvacrol, thymol, p-cymene<br>Linalool, carvacrol, thymol | Kulevanova *et al*. (1996a)<br>Kulevanova *et al*. (2002) |
| ***T. atticus*** | Greece | (E)-Nerolidol (17.5)<br>1,8-Cineole (11.8)<br>Camphene (11.5) | (*E*)-Nerolidol, β-caryophyllene, germacrene D<br>1,8-Cineole, myrcene, β-caryophyllene<br>Camphene, α-pinene, caryophyllene oxide | Tzakou et Constantinidis (2005) |
| ***T. aureopunctatus*** | Bosnia et Herzegovina | Thymol (34.5) | Thymol, thymol methyl ether, *p*-cymene | Cavar *et al*. (2009a) |
| ***T. capitatus*** | Albania | Carvacrol (57.8)<br>Carvacrol (71.5)<br>Carvacrol (77.8)<br>Carvacrol (78.0) | Carvacrol, *p*-cymene, γ-terpinene<br>Carvacrol, *p*-cymene, γ-terpinene<br>Carvacrol, *p*-cymene, γ-terpinene<br>Carvacrol, *p*-cymene, γ-terpinene | Ibraliu *et al*. (2011) |
| | Croatia | Carvacrol (75.9) | Carvacrol, 1,8-cineole, limonene | Kustrak *et al*. (1990) |
| | Greece | Carvacrol (75.3)<br>Carvacrol (67.0) | Carvacrol, *p*-cymene, γ-terpinene<br>Carvacrol, thymol, borneol | Gitsopoulos *et al*. (2013)<br>Skrubis (1972) |
| ***T. ciliatopubescens*** | Macedonia | 1,8-Cineole (18.0) | 1,8-Cineole, α-pinene, camphene | Kulevanova *et al*. (1998a) |
| ***T. comosus*** | Romania | Caryophyllene oxide (54.8)<br>Neryl acetate (24.4) | Caryophyllene oxide, camphene, β-bourbene<br>Neryl acetate, carvacrol, thymol | Pavel *et al*. (2009)<br>Kisgyorgy *et al*. (1983) |
| ***T. dacisus*** | Romania | Carvacrol (30.0) | Carvacrol, thymol, nerol | Kisgyorgy *et al*. (1983) |
| ***T. glabrescens*** | Bosnia & Herzegovina | a-Terpinyl acetate (32.0) | α-Terpinyl acetate, terpinen-4-ol, thymol | Karuza-Stojakovic *et al*. (1989) |

# Conclusion

# Conclusion

Notre travail consiste à extraire par hydrodistillation l'huile essentielle à partir la plante médicinale : *Thymus capitatus*, récoltée au printemps 2017de la région de Bahrara et Djebel Omran dans la steppe sud algéroise et à tester son effet sur quelques souches bactériennes *(Salmonella typhii, Enterococcus fecalaes, Escherichia coli, Klebsiella pneumonae, Salmonella enterica , Micrococcus leteus, Staphylococcus aureu, Bacillus cereus).*

Le volume d'huile essentielle obtenu après l'extraction nous a permis d'estimer un rendement égal à 0.4632% pour la région de Djebel Omran et de 0.4113% pour la région de Bahrara, qui sont considérés comme faibles en comparaison avec plusieurs rendements en huile essentielle du même genre.

Les tests de l'effet antibactérien de l'huile essentielle sur les 8 souches testées, en appliquant la méthode de l'aromatogramme a révélé une efficacité très élevée sur tous les souches, la micro-atmosphère révèle une efficacité modérée.

La chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG/SM) ce révélé qu'il y a une déférence dans la composition chimique dès les deux régions ou :

Bahrara : α-terpineol acetate et L-camphor

Djebal Omran : α-terpineol acetate

Divers facteurs tels que l'espèce, la période de récolte, l'âge de la plante, l'humidité du matériel végétal, la partie soumise à la distillation et la technique d'extraction peuvent influencer le rendement, les caractéristique physique et la composition chimique des huiles essentielles.

Le *Thymus capitatus* est une plante qui présente un potentiel promettant dans le domaine médical et économique.

Perspective : A la lumières des résultats expérimentaux obtenus au terme de la présente étude, il serait nécessaire d'approfondir la caractérisation chimique par des méthodes plus poussées ainsi que l'évaluation du pouvoir antibactérien « in-vivo » sur des modèles animaux.

# Références

# bibliographiques

**Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., 1998,** Antifungal Activities of Origanum vulgare subsp. Hirtum, Mentha spicata, Lavandula angustifoia, and Salvia fruticosa Essential Oils against HumanPathogenic Fungi. J. Agric.Food Chem., Vol. 46, No 6, p.1739-1745.

**Adams R.P., 2007,**Identification of essential oil components by gas chromatography /massspectrometry, 4th Ed Allured Publishing Corporation, p.804.

**Albericio F., 2010,** De la conception du médicament à son développement : l'indispensable chimie. In : **Bach J.-F., Blanchard-Desce M., Couvreur P., Darel F., 2010**, La chimie et la santé, au service de l'homme. EDP Sciences, p. 77-90.

**Allaf K., 1989 ,**Nouveau procédé de traitement par détente instantanée contrôlée de produits biologiques divers en vue de leur déshydratation. Recherche exploratoire. Abondement ANVAR – Gradient Publication de l'université de technologie de Compiègne N° SE/89/346. Rapport intermédiaire, décembre 1989.

**Allaf K., Louka N., Bouvier J.M., Parent F. Et Forget J.M., 1994,** Procédé de traitement de produits biologiques en vue de la modification de leur texture, installations pour la mise en œuvre d'un tel procédé et produits ainsi réalisés, French patent n° 93/09728, 1993, International extension PCT FR 94/00975, 1994.

**Andrews J.M., 2001,**The Development of the BSAC standardized method of disc diffusiontesting. J. Antimic. Chemo., Vol. 48, Suppl. S1, p.29-42.

**Anklam E., Berg H., Mathiasson L.Sharman M. Et Ulberth F., 1998,** Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis : a review. Food addit. Contam., Vol. 15, p. 729 – 750.

**Badiaga M., 2011,** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia Smith., une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de Doctorat. Mali : Université de Bamako.

**Baltz R. H., 2008,** Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. Current Opinion in Pharmacology, Vol. 8, No 5, p. 557-563.

**Benkeblia N., 2004,** Antimicrobial activity of essentiel oil extracts of various onions (Allium cepa) and garlic (Allium sativum), Lebensm.-Wiss.U-Technol., p. 263-268.

**Benyoussef E.H., Hasni S., Belabbes R., Bessiere J-M., 2002,**Modelisation du transfére de matiére lors de l'extraction de l'huile essentielle des fruits de coriandre.,*Chemical Engineering Journal*, Vol.1,No 5,p.2.

**Bhattacharjee P., Ranganathan T.V., Singhal R.S., Kulkarni P.R., 2003,**Comparative aroma profiles using supercritical carbon dioxide and LikensNickerson extraction from a commercial brand of Basmati rice. J. Sci. Food Agric, Vol. 83, p.880 – 883.

**Borchers, A. T., Keen, C. L., Hannum, S. M., Gershwin, E. M.,2000,** Cocoa and chocolate: Composition, Bioavailability and Health implications. Journal of Medicinal Food, Vol. 3, No 2, p. 77-105.

**Bousbia N., 2011,** Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants a partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Autre, Université d'Avignon. Institut national agronomique El Harrach. Algerie, p 76-70.

**Bozin B., Mimica-Dukic N., Simin N., Anackov G., 2006**, Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils, J Agric Food Chem, Vol.54, No.5, p.1822–1828.

**Brat P., 2001 ,**Application d'un nouveau procédé d'extraction (jus, pulpe, huile essentielle) : La flash-Détente. Journée professionnelle Cirad-flhor – Conservation et transformation du fruits : nouveaux enjeux, nouvelles techniques. Montpellier – France. URL : http://technofruits2001.cirad.fr/fr/brat.htm

**Bruneton J.,2009,** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales., 4 Eme ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier.

**Callery E., 1998,** Le grand livre des herbes : Le guide pratique de la culture, du séchage et des vertus de plus de 50 herbes. Cologne : Könemann Verlag.

**Catier O., Roux D.,2007,** Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie : Cahiers du réparateur en pharmacie. 3 ème ed. France : Wolters Kluwer.

**Cavar S., Maksimovic M., Vidic D., 2009a,** The essential oil of Thymus aureopunctatus (Beck) K Maly, Nat Prod Commun, Vol.4, No 3, p.415–420.

**Chao S.C., Young D.G., Oberg G. J., 2000,** Screening for Inhibitory Actvity ofEssential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. J. Essent. Oil Res., Vol. 12 (Sep/Oct 2000), p.639-649.

**Chebil L., 2006,** Acylation des flavonoïdes par lipases de Candida antartica et de Pseudomonas cepacia : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de Doctorat.Lorraine : INPL.

**Chemat F., Tomao V. Et Virot M., 2008,** Ultrasound-assisted extraction in food analysis. In Handbook of Food Analysis Instruments by Semith ötles (pp. 85 – 103). Boca Raton, Florida, USA : CRC Press.

**Chemat S., Lagha A., Ait Amar H., Bartels P.V., Chemat F., 2004a,** Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone andlimonene from caraway seeds. Flavour and Fragrance Journal, Vol. 19, p. 188 – 195.

**Chemat S., Lagha A., Ait Amar H., Chemat F., 2003,** Ultrasound assisted microwave digestion. Ultrasoni.Sonochemi., Vol. 11, p.5-8.

**Chorianopoulo N., Kalpoutzakis E., Aligiannis N., Mitaku S., Nychas G.J., Haroutounian S.A., 2004**, Essential oils of Satureja, Origanum, and Thymus species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens, J Agric Food Chem ,Vol.52, No 26, p.8261–8267.

**Cicile J.C., 1994,** Distillation. Absorption 1. Généralités sur les colonnes de fractionnement.

**Cicile J.C., 2002,** Distillation. Absorption Etude pratique, Techniques de l'ingénieur J 2610 p.1-20.

**Collin S., Crouzet J., 2011,** Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Paris : Tec & Doc Lavoisier.

**Conner D.E. Et Beuchat L.R., 1984,** Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oilsof plants. Appl. Environ.Microbiol., Vol. 47, p.229-233.

**Corcoran O., Spraul M., 2003**, LC–NMR–MS in drug discovery. Drug Discovery Today, Vol. 8, No 14, p. 624-631.

**Craveiro A.A., Matos F.J.A., Alencar J.W., Plumel M.M., 1989,** Microwave oven extraction of an essential oil. Flav. Fragr J., Vol. 4, p. 43 – 44.

**Crouzet J., 1998,** Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur F 4 100, p. 1 – 18.

**Crozier A., Jaganath I. B., Clifford M. N., 2009,** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. Natural Product Reports, Vol. 26, No 8, p.1001-1043.

**Dob T., Darhmane D., benadbelkader T., Chelgoum C., 2006**, Studies on the essential oils and antimicrobial activity of Thymus algeriensis Boiss and Reut., International Journal of aromatherapy, Vol.16, No 2, p.95-100.

**Duarte C., Moldao-Martins M., Gouveia A.F., Beirao Da Costa S.,Leitao A.E., Bernardo-Gil M.G., 2004,**Supercritical fluid extraction of red pepper (Capsicum rutescens L.). J. Supercrit. Fluids, Vol. 30, p.155 –161.

**Dugo G. et Di Giacomo A., 2002**, Citrus, the genus Citrus. Medicinal and aromatic plants – Industrial profiles, Ed.CRC Taylor and Francis Group,p.642.

**Edward P., Claus. Varro E.T. et Lynn R. B., 1987**, Pharmacognosy, 6th Ed LEA et Febiger, p.184-187

**El Kalamouni C., 2010,** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits deplantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, thèse du doctorat, université de Toulouse, p.69.

**Eskilsson C. S. etBjorklund E., 2000,** Analytical-scale microwave-assisted extraction. J. Chromatogra. A, Vol. 902, p.227-250.

**Essawi T. et Srour M., 2000,** Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity., Journal Of Ethnopharmacology , Vol.70, p.343-349.

**Forkmann G., Martens S., 2001,** Metabolic engineering and applications of flavonoids,Current Opinion in Biotechnology,Vol. 12, No 2, p. 155-160.

**Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. et Rasooli I., 2007,** Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils, Food Chem., p.898-904.

**Gahbiche S., 2009**, L'aromathérapie, Certificat Thalassothérapie, école supérieure des sciences techniques de la santé de Sousse, p.1.

**Garnero J., 1996,** Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur K345, p.1-45.

**Gitsopoulos T.K., Chatzopoulou P., Georgoulas I., 2013**, Effects of essential oils of Lavandula x hybrida Rev., Foeniculum vulgare Mill. and Thymus capitatus L. on the germination and radical length of Triticum aestivum L., Hordeum vulgare L., Lolium rigidum L. and Phalaris brachystachys L, J Essent Oil Bear Plants, Vol.16, No 6, p.817–825.

**Graham L. P., Depovere P.,2002,** Chimie pharmaceutique, Ed De Boeck, p. 154.

**Guenther E., 1949,** The essential oils. D. Van Nostrand Co., New York, N.Y.

**Gutman L., service de microbiologie de l'hôpital européen Georges Pompidou, 2013** , Résistance aux antibiotiques : de la résistance naturelle à la résistance acquise, Université Paris, Descartes, p.2.

**Handelsman J., Rondon M. R., Brady S. F., Clardy J., Goodman R. M.,1998**, Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes, a new frontier for natural products,Chemistry & Biology, Vol. 5, No 10, p. R245-R249.

**Heath H.B.,1981,** Source book of flavours.,1st Ed. Springer.

**Hoferl M., Buchbauer G., Jirovetz L., Schmidt E., Stoyanova A., Denkova Z., Slavchev A., Geissler M., 2009**, Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents, J Essent Oil Res, Vol.21, No 5, p.459–463.

**Hopkins W. G., 2003**, Physiologie végétale, 1 ère Ed, Bruxelles : De Boeck & Larcier s.a.

**Ibraliu A., Mi X., Ristic M., Stefanovic Z.D., Shehu J., 2011**, Analysis of essential oils of three wild medicinal plants in Albania, J Med Plants Res, Vol.5, No 1, p.58–62.

**Jalal M. A. F. et Collin H. A.,1997,** Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of Theobroma cacao. Phytochemistry, Vol. 16, No 9, p. 1377-1380.

**Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A., Stevens P., 2002,** Botanique systématique : Une perspective phylogénétique. 1 ère Ed. Paris : De Boeck Supérieur.

**Karuza-Stojakovic L., Pavlovic S., Zivanovic P., Todorovic B., 1989,** Composition and yield of essential oils of various species of the genus Thymus L, Arh Farm, No 39, p.105–111.

**Khalifa M. et Benmechih Z., 2012,** extraction de l'huile essentielle de *Salvia verbenaca batt*. De la région de Djelfa et évaluation de ses propriétés antibactériennes « in vitro ». Mémoire ingéniorat université Ziane Achour-Djelfa, p.15-17-39- 48.

**Kheyar N., 2014,** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la region de Bejaia, *Algerian Journal of Natural Products*. Vol.2 ,No1, p.19.

**Kimball D.A., 1999,**Citrus processing : A complete guide. 2nd ed, Aspen Publication inc, p.435.

**King J.W., 2004,** Critical fluid technology for the processing of lipid-related natural products,Comptes Rendus Chimie, Vol. 7, p.647- 659.

**Kingston D. G. I., 2011,** Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation, Journal of Natural Products, Vol. 74, No 3, p. 496–511.

**Kingston M.M. et Haswell S.J., 1997,**Microwave – Enhanced Chemistry, Fundamentals, Sample Preparation, and applications. Ed American Chemistry Society, Washignton .DC, p.772.

**Kisgyorgy Z., Csedo K., Horster H., Gergely J., Racz G., 1983**, The volatile oil of the more important indigenous Thymus species occurring in the composition of Serpylli herba, Rev Med Vol.29, No 1–2, p.124–130.

**Koehn F. E., Carter G. T., 2005,** The evolving role of natural products in drug discovery, Nature Reviews Drug Discovery, Vol. 4, No 3, p. 206-220.

**Krief S., 2003,** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : Surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat. Gif-sur-Yvette: MNHN, p.60.

**Kulevanova S., Kaftandzieva A., Dimitrovska A., Stefkov G., Panovski N., 2002**, Potential antimicrobial activity of the essential oil of some Macedonian Thymus tosevii Vel. (Lamiaceae) varieties, Acta Pharmaceut, No 52, p.305–311.

**Kulevanova S., Ristic M., Stafilov T., 1996a**, Composition of the essential oil from Thymus moesiacus from Macedonia, Planta Med, Vol.62, No 1, p.78–79.

**Kulevanova S., Ristic M., Stafilov T., 1998a**, The essential oils of Thymus balcanus, T. ciliatopubescens and T. pseudoatticus from Macedonia, Acta Pharma, No 48, p.119–126.

**Kulevanova S., Ristic M., Stafilov T., Matevski V., 1998d**, Composition of the essential oils of Thymus albanus ssp. albanus H. Braun. from Macedonia, J Essent Oil Res, No 10, p.335–336.

**Kustrak D., Martinis Z., Kuftinec J., Blazevic N., 1990**, Composition of the essential oils of some Thymus and Thymbra species, Flavour Fragr J, No 5, p.227–231.

**Lawrence B.M., 1992**, Chemical components of Labiate oils and their exploitation .In : Harley R.M., Reynolds T., Advances in Labiate science, Ed Royal Botanic Gardens, Kew, p.399–436.

**Leitao C., 2011,** Etude de composés à intérêt technologique et fonctionnel dans la bière, Thèse de Doctorat, Strasbourg : IPHC, p.80.

**Lemarchand F., Courvalin P., 2008**, Back to basic : Les antibiotiques, La recherche: l'actualité des sciences, No.424, p.77.

**Leybros J. et Fremeaux P., 1990,** Extraction solide-liqude, aspect théorique, Techniques de l'ingénieur J 2780 p.7-8.

**Lucchesi M. E., Chemat F., Smadja J., 2004a,**Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation,J. Chromato A, Vol. 1043, p.323-327.

**Lucchesi M. E., Chemat F., Smadja J., 2004b :**An original solvent freemicrowavextraction of essential oil from spices, Flavour Fragrance J., Vol. 19, p.134– 138.

**Luque De Castro M.D., Friego-Capote F., 2007,**Ultrasound assistance toliquidliquid extraction : A debatable analytical tool,Analytica Chimica Acta, Vol.583, p.2 – 9.

**Mabberley D.J., 1997**, The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants, 2nd Ed Cambridge University Press, Cambridge.

**Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., 2005,** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes.

**Maksimovic Z., Milenkovic M., Vucicevic D., Ristic M., 2008,** Chemical composition and antimicrobial activity of Thymus pannonicus All. (Lamiaceae) essential oil, Cen Eur J Biol Vol 3, No 2, p.149–154.

**Mason T.J. et Cintas P., 2002,** Sonochemistry, Chapitre 16, p.372 - 396 In Clark J. Et Macquarrie D., 2002, Handbook of Green Chemistry and Technology, Ed Blackwell Science Ltd, p.540.

**Mengal P., Behn D., Bellido Gil M., Monpon B., 1993,** VMHD : extraction d'huile essentielle par micro-ondes, Parfums. Cosmétiques.Arômes, Vol. 114, p.66-67.

**Mocali S., Benedetti A., 2010,** Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology,Research in Microbiology, Vol. 161, No 6, p. 497-505.

**Mokhtari Z., 2014,** Extraction et évaluation de propriétés antibactériennes « in-vitro » de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba Asso*, de la région de Djelfa, Mémoire master université de Djelfa, p.55-59.

**Moldao-Martins M., Gabriela Bernardo-Gil M., Luisa Beirao da Costa M., 2002**, Sensory and chemical evaluation of Thymus zygisL essential oil and compressed CO2 extracts., Eur Food Res technol, No 214, p.207-211.

**Möller K., 2008,** La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous, Ed UNICO, p.152.

**Morales R., 1997**, Synopsis of the genus Thymus L. in the Mediterranean area, Lagascalia , Vol.19, No1–2, p.249–262.

**Moss G. P., 2000,** Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000),Pure and Applied Chemistry, Vol. 72, No 8, p. 1493-1523.

**Moulin J.P., Pareau D., Rakib M., Stambouli M., 2002,** Transfert de matière. Extraction liquide – liquide, Techniques de l'ingénieur J1073, p. 1 – 13.

**Paré J.R.J., 1994,** Microwave extraction of volatile oils, Brevet américain, US 5 338 557.

**Paré J.R.J., Sigouin M., Lapointe J., 1990,** Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes, **Brevet européen**, EP 398798.

**Paré J.R.J., Sigouin M., Lapointe J., 1991,** Microwave assisted natural product extraction, **Brevet américain**, US 5 002 784.

**Pavel M., Radulescu V., Ilies D.C., 2009**, GC-MS analysis of essential oil obtained from the species Thymus comosus Heuff. ex Griseb. (Lamiaceae), Farmacia Vol.57, No 4, p.479–484.

**Pellerin P., 1991,** Spercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry,Perfum. Flav., Vol. 16, p.37 – 39.

**Pellerin P., 2001,** Extraction par le CO2 à l'état supercritique, Ann. Fals. Exp. Chim, Vol. 94.

**Perrut M.**, **1999,** Extraction par fluide supercritique. Les techniques de l'ingénieur. J 2 770.

**Peyron L., 1992,** Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques, Chapitre 10, p.217 – 238. Cité In : Les arômes alimentaires. Coordinateurs RICHARD H. et MULTON J.-L. Ed. Tec & Doc-Lavoisier et Apria, p.438.

**Ponce A.G., Fritz R., del Valle C., Roura S.I., 2003,** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, Lebensm.-Wiss.u.-Technol,No 36, p.679-684.

**Quetin-Leclercq J.,2002**, Le voyage insolite de la plante au médicament, Journal de Pharmacie de Belgique, Vol. 57, HS 2, pp. 11-20.

**Rezzoug S.A., Louka N., Maache-Rezzoug Z., Nouviaire A., Allaf K., 1998,** Présentation du séchage couple à la texturation par détente instantanée contrôlée, Application aux produits agro-alimentaires en morceaux 10ème , p.319 – 324.

**Ribéreau-Gayon P.,1998,** Les composés phénoliques des végétaux, Paris : Dunod, 1968

**Roberts, M. F., Wink, M. Alkaloids**, Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. New York: Plenum Press, p150-156.

**Salisova M., Toma S.,Mason T.J., 1997,**Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from Salvia officinalis, Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 4, p. 131 – 134.

**Santos-Buelga C., Scalbert A., 2000,** Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature.Occurrence. dietary intake and effects on nutrition health, Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 80, No 7, p. 1094-1117.

**Sarrazin C., Le Quère J.-L., Gretsch C. Et Liardon R., 2000,** Representativeness of coffee aroma extracts, comparison of different extractionmethods,Food chem, Vol. 70, p. 99 – 106.

**Scimeca D., 2006,** Les plantes du bonheur : Retrouvez naturellement bien être et plaisir de vivre, Monaco : Alpen.

**Scimeca D., Tétau M., 2005,** Votre santé par les plantes : Le guide familial pour prévenir et guérir tous les maux quotidiens, Monaco : Alpen.

**Sebastiani E., Dugo G., Cotroneo A., 1983,**Sulla genuinita delle essenzeagrumarie. Nota V. Valutazione di alcuni tipi di fasi stazionarie per I'analisi dellafrazione volatile degli olii essenziali di limone mediante gascromatografia ad altarisoluzione. Essenz.Deriv. Agrum., Vol. 53, p.501-514.

**Senorans F.J. , Ruiz-Rodriguez A., Ibanez E., Tabera J., Reglero G.,2003,** Isolation of brandy aroma by countercurrent supercritical fluid extraction. J.supercrit. Fluids, Vol. 26, p. 129 – 135.

**Shapiro M. J., Gounarides J. S.B, 1999,** NMR methods utilized in combinatorial chemistry research, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy,Vol. 35, No 2, p. 153-200.

**Sipailiene A., Venskutonis P.R., Baranauskiene R., Sarkinas A.,2006,**Antimicrobialactivity of commercial samples of thyme and marjoram oils., Journal of Essential OilResearch, Vol.18, p.698-703.

**SKOOG D.A., HOLLER F.J. et NIEMAN T.A., 2003,**Principes d'analyse instrumentale. Ed De Boeck Diffusion s.a.,p.956.

**Small E., Catling P., 2000**, M. Les cultures médicinales canadiennes. Canada: Ottawa (Ontario), NRC Research Press, p.650-658.

**Sofowora A., 2010,** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, Académie suisse des sciences naturelles : Karthala.

**Sokovic M., Glamoclija J., Marin PD., Brkic D., van Griensven L., 2010,** Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model, Molecules Vol.15, No.11, p.7532–7546.

**Stahl-Biskup E., Saez F., 2002**, Thyme. The genus Thymus, Taylor & Francis, UK.

**Stashenko E.E., Jaramillo B.E. Et Martinez J.R., 2004b ,**Comparison ofdifferent extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of Lippia alba (Mill.) N.E. Brown,grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidantactivity. J.Chroma. A., Vol. 1025, p. 93 – 103.

**Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martinez J.R., 2004a,** Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian Xylopia aromatica (Lamarck) by differentextraction and headspace methods and gas chromatography. J. Chroma. A., Vol. 1025, p.105-113.

**Stöckigt J., Sheludk Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D., 2002**, High- performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic- electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. Journal of Chromatography A, Vol. 967, No 1, p. 85-113.

**Tétau M. ,2005,** Articulations : Votre ordonnance naturelle. Monaco : Alpen, p.54-69.

**Toursel P., 1997,** Extraction high-tech pour notes fraîches. Process, Vol. 1128, p. 38 – 41.

**Tranchant J., Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Vergnol A., Witier P., 1995,** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4 ème Ed MASSON, p.700.

**Turner C., 2006,** Modern extraction techniques. Food and agricultural samples, ACS Symposium Series 926, American Chemical Society, Washington DC, p.189.

**Turner G., Gershenzon J., Nielson E. E., Froehlich J. E., Croteau R.,1999,** Limonene synthase.the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint.is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells,Plant Physiology, Vol.120, No 3, p. 879–886.

**Tzakou O., Constantinidis T., 2005**, Chemotaxonomic significance of volatile compounds in Thymus samius and its related species Thymus atticus and Thymus parnassicus, Biochem Syst Ecol, Vol.33, No 11, p.1131–1140.

**Van Den Dool H., Kratz P.D., 1963,** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. J. Chromato. A., Vol. 11, p.463-471.

**Vercauteren J.,2011,** Plan, formules et illustrations du cours de Pharmacognosie. 2 Eme cycle des études de Pharmacie.Montpellier I, p.256-258.

**Verpoorte R., Choi Y. H., Kim H. K., 2007,** NMR-based metabolomics at work in phytochemistry, Phytochemistry Reviews, Vol. 6, No1, p. 3-14.

**Vinatoru M., 2001 ,**An overview of ultrasonically assisted extraction of bioactiveprinciples from herbs, Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 8, p.303-313.

**Vinatoru M., Toma M., Mason T.J., 1999 ,**Ultrasound-assisted extraction ofbioactive principles from plants and their constituents. Adv. Sonochem., Vol. 5, p. 209 – 247.

**Vinatoru M., Toma M., Radu O., Filip P.I., Lazurca D. Et Mason T.J., 1997 ,** The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials, Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 4, p. 135 – 139.

**Vivas de Gaulejac N., 2001,** Vin et santé, Les bases scientifiques du French Paradox. Bordeaux : Féret, p.65.

**Vivas de Gaulejac N., 2002,** Manuel de Tonnellerie. Bordeaux : Féret, p.201.

**Vladimir-Knezevic S., Kosalec I., Babac M., Petrovic M., Ralic J., Matica B., Blazekovic B., 2012**, Antimicrobial activity of Thymus longicaulis C. Presl. essential oil against respiratory pathogens, Cent Eur J Biol Vol.7, No 6, p.1109–1115.

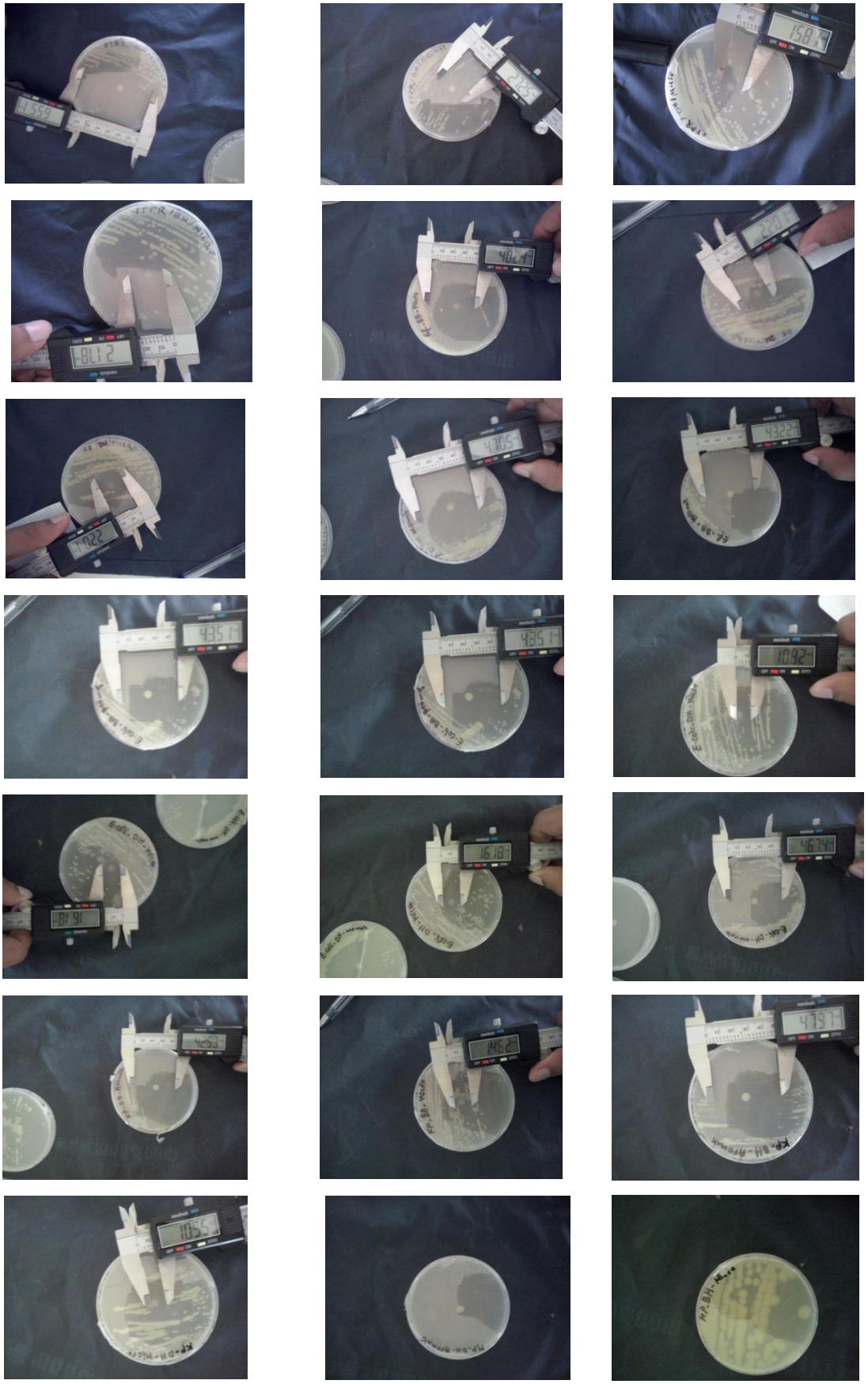
**Wichtl M., Anton R., 1999,** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 3 ème ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier.

**Wijesekara R.O.B., Ratnatunga C.M., Durbeck K., 1997,** The distillation of essential oils, Manufacturing and plant Construction Handbook. Eschborn, Federal Republic of Germany, Protrade, Department of food stuffs & Agriculturak Products, p.523-530.

**Winkel-Shirley B., 2002,** Biosynthesis of flavonoids and effects of stress, Current Opinion in Plant Biology, Vol. 5, No 3, p. 218-223.

**Zenk M. H., Juenger M., 2007,** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds, Phytochemistry, Vol. 68, No.22-24, p. 2757-2772.

# Annexe



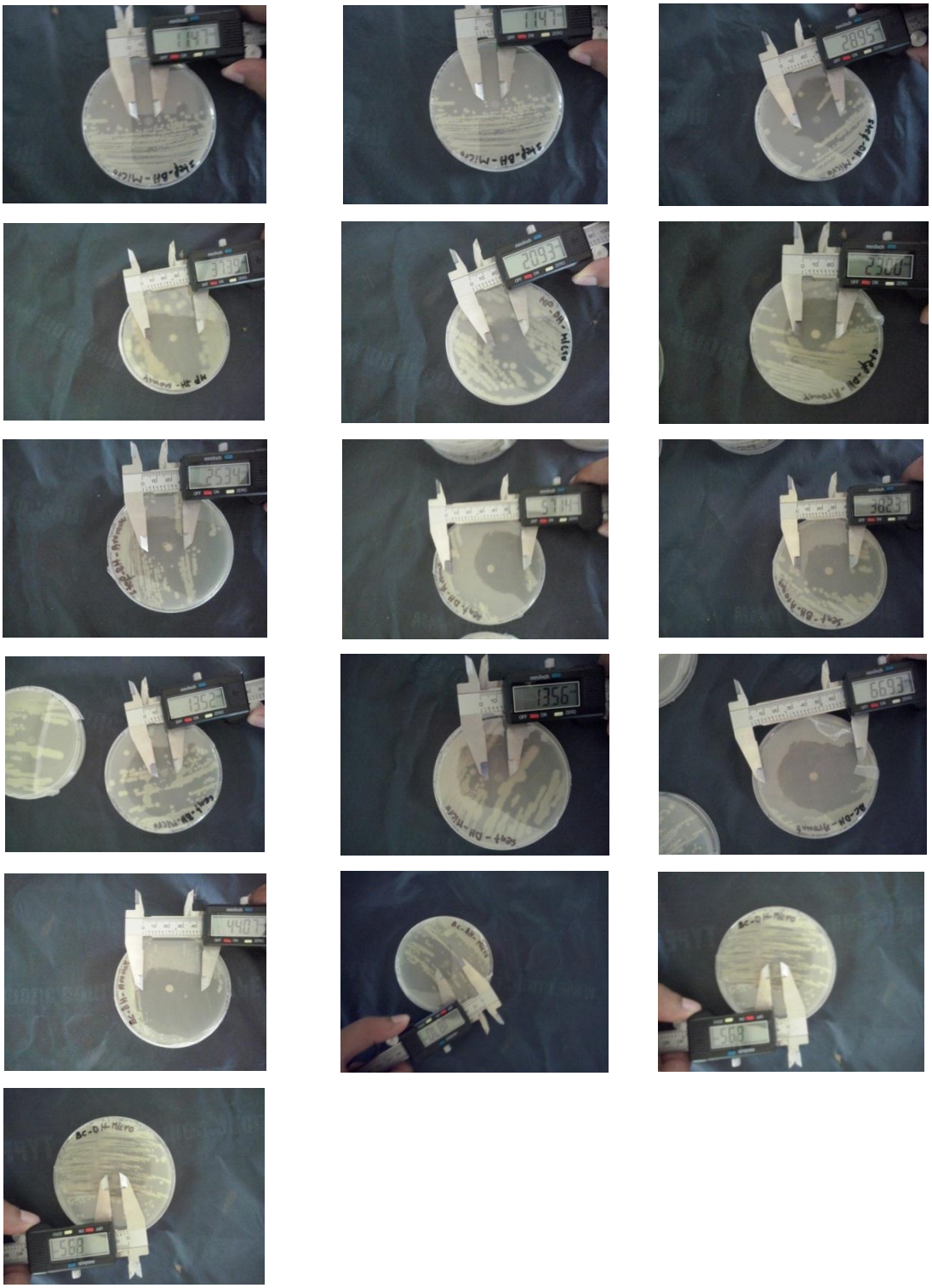


**Figure. 45** La mesure des diamètres des halos d'inhibition **(Original, 2017).**

## ملخص:

الهدف من عملنا هو استخراج, عن طريق التقطير بالبخار, الزيوت الطيارة من النبات الطبي: الزعتر ، الذي تم قطفه في منطقة بحرارة و جبل عمران بولاية الجلفة في ربيع 2017، من أجل تقدير مردوده ، وتقدير نشاطه المضاد للبكتيريا, تم اختبار سلالة من كل من البكتيريا التالية *Salmonella typhii, Enterococcus fecalaes, Escherichia coli, Klebsiella pneumonae, Salmonella enterica , Micrococcus leteus, Staphylococcus aureu, Bacillus cereus*. قمنا بتقدير التأثير المضاد للبكتريا بالتطبيق المباشر و الأتأثير بالمواد الطيارةة و هذا دل عل عملية عاليةة المكونات الكميائة تم التعرف عليها بالكروماتوغرافي و الكروماتوغرافي المرفوقة بالغاز ووجدنا أن المكونات الأساسية هي α-.terpineol acetate ,L-camphor



**الكلمات الاساسية** : الزعتر ،التقطير بالبخار، الزيوت الطيارة, المبيد, الكروماتوغرافي.



## Résumé:

Le but de notre travail est l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle d'une plante médicinale : *Thymus Capitatus* récoltée dans la région de Bahrara et Djebel Omrane, wilaya de Djelfa au printemps 2017, afin de : Estimer son rendement, tester l'activité antibactérienne de l'huile essentielle vis-à-vis de huit souches qui sont les suivantes : *Salmonella typhii, Enterococcus fecalaes, Escherichia coli, Klebsiella pneumonae, Salmonella enterica , Micrococcus leteus, Staphylococcus aureu, Bacillus cereus*. On a appliqué la méthode de l'aromatogramme et la micro-atmosphère. Ca révèle une efficacité très élevée. La composition chimique des huiles essentielles a été déterminée par la technique de chromatographie en phase gazeuse (CG) et la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG/SM) Ca révèle que les produits majoritaire sont α-terpineol acetate et L-camphor.



**Mots clés** : *Thymus Capitatus*, hydrodistillation, huiles essentielles, aromatogramme, micro-atmosphère, chromatographie en phase gazeuse (CG), chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG/SM).



## Abstract:

The aim of our work is the extraction by hydrodistillation of the essential oil of a medicinal plant: *Thymus capitatus*, harvested in the region of Bahrara and Djebel Omrane (Djelfa) in spring 2017, in order to estimate its yield, and to test the antibacterial activity of the essential oil towards the eight strains : *Salmonella typhii, Enterococcus fecalaes, Escherichia coli, Klebsiella pneumonae, Salmonella enterica , Micrococcus leteus, Staphylococcus aureu, Bacillus cereus.* We applied the method of aromatogram and micro-atmosphere, this revealed a high effectiveness. The chemical composition of essential oil was determined by gas chromatography (GC) and gas chromatography–mass spectrometry (GCMS) analysis. And they revealed that the Major constituents are α-terpineol acetate and L-camphor.



**Kyewords** : *Thymus Capitatus*, Hydrodistillation, essential oils, aromatogram, micro-atmosphere, gas chromatography (GC), gas chromatography–mass spectrometry analysis (GCMS).