

N° d'ordre :100/2017-C/GP

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene
Faculté de Génie Mécanique & Génie des Procédés



Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de **DOCTORAT** 3^{ème} cycle

En: GÉNIE DES PROCÈDES

**Spécialité: Génie des Procédés Industriels: Génie des Procédés
Pharmaceutiques**

Par: M^{me} Lilia MOUHI

Sujet

***Étude des activités biologiques de l'association des huiles
essentielles de plantes de la flore Algérienne. Élaboration
d'une forme pharmaceutique.***

Soutenue publiquement, le 09/12/2017, Devant le jury composé de:

F. BENTAHAR	Professeur à l'USTHB	USTHB	Présidente
H. MOGHRANI	Professeur à l'USTHB	USTHB	Directrice de thèse
F. KHAMMAR	Professeur à l'USTHB	USTHB	Examinatrice
A. AMRANE	Professeur à l'USTHB	U. Rennes 1	Examineur
E. BENYOUSSEF	Professeur à l'ENP	ENP	Examineur
M. MELLAL	MCA à l'USTHB	USTHB	Examineur
R. MAACHI	Professeur à l'USTHB	USTHB	Invitée

Résumé

Dans le cadre de la valorisation de la flore Algérienne, nous avons réalisé une étude sur les bienfaits thérapeutiques des associations des huiles essentielles et extrait de diverses plantes. L'huile essentielle de base considérée, est celle d'une plante aromatique, le *Thymus fontanesii*, appartenant à la famille des labiées et originaire d'Algérie.

La caractérisation de l'huile essentielle de cette espèce de thym récoltée dans les montagnes de Médéa (Algérie), a révélé un composé majoritaire, le Carvacrol (66.3%). L'évaluation de plusieurs activités biologiques et pharmacologiques de cette huile essentielle a dévoilé des propriétés thérapeutiques remarquables expliquant la persistance de son usage traditionnel.

Pour l'évaluation des bienfaits thérapeutiques des associations des huiles essentielles et extrait de plantes, nous avons réalisé en premier lieu, l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* seule, ainsi qu'en association avec les huiles essentielles de la Menthe poivrée (*Mentha piperita*) et avec celle de l'Orange douce (*Citrus sinensis*).

En second lieu, l'évaluation de l'activité cicatrisante d'une formulation à base de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* seule et en association avec le gel de l'*Aloe arborescens* a été élaborée.

Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* a amélioré le pouvoir antimicrobiens des deux autres et que la formulation cicatrisante comportant les deux extraits associés présente un spectre d'action plus large que celui de chaque extrait utilisé seul.

Mots-clés: *Thymus fontanesii*, huile essentielle, Carvacrol, associations d'extraits, analyse d'images, activité antimicrobienne, activité cicatrisante.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je voudrais remercier le Professeur MOGHRANI Houria, qui a accepté de diriger cette thèse, en m'intégrant dans son équipe de recherche. Ses conseils et orientations m'ont permis de mener à bien cette passionnante étude à ses côtés. Je réitère mes remerciements les plus sincères à son égard.

Toute ma reconnaissance va au Professeur BENTAHAR Fatiha qui a accepté de présider ce jury de thèse. C'est un honneur et un immense plaisir de lui présenter ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement le professeur AMRANE Abdeltif, professeur à l'Université de Rennes pour ses conseils et encouragements qui ne m'ont jamais fait défaut tout au long de ce travail. Disponibilité et écoute sont les qualités que je souhaite souligner.

Mes sincères remerciements vont aussi à l'adresse du Professeur BENYOUCEF de l'école polytechnique d'Alger et au Professeur KHAMMAR de la faculté des sciences biologiques de l'USTHB, pour avoir accepté de siéger dans ce jury et de me réserver un peu de leur précieux temps.

L'occasion m'est offerte pour témoigner de mon estime au Docteur MELLAL Mounir, Maître de Conférences à l'USTHB. Cette estime, qui remonte à la troisième année de mon cycle universitaire n'a jamais été démentie. C'est avec un grand plaisir que je note qu'il a accepté de siéger dans ce jury.

Ma gratitude va également au professeur MAACHI Rachida doyenne de la faculté pour tout le soutien moral et matériel qu'elle a consenti à m'accorder.

Je salue également le personnel de l'Institut Pasteur ainsi que ceux du centre de recherche et de développement CRD- SAIDAL.

Ma famille, en particulier mon père, pour l'attention toute particulière dont il a porté à mes études. Ce travail est le fruit d'énormes sacrifices. Trouve ici le témoignage de ma profonde affection.

Je ne saurais terminer cette série de remerciement sans penser à tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé et encouragé au cours de la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

Chapitre I. Partie bibliographique

I.1. Introduction	4
I.2. Généralités sur les huiles essentielles.....	4
I.2.1. Définition d'une huile essentielle	4
I.2.2. Localisation des huiles essentielles	4
I.2.3. Composition chimique des huiles essentielles.....	5
1. Les composés terpéniques	5
2. Les composés aromatiques	6
I.2.4. Techniques d'analyse des huiles essentielles.....	6
➤ Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	6
➤ Spectroscopie de masse (SM).....	7
➤ Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) ...	8
I.2.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	9
1. Hydrodistillation ou distillation à l'eau	9
2. Entrainement à la vapeur d'eau	10
I.2.6. Cinétique de l'extraction des huiles essentielles	12
I.2.7. Application de modèles à la cinétique de l'extraction des huiles essentielles	13
➤ Modèle cinétique à un site de désorption.....	13
➤ Modèle cinétique à deux sites de désorption	14
I.3. Technique de l'analyse d'images	15
I.3.1. Description d'une image	15
I.3.2. Etape de l'analyse des images	15
I.3.3. Les outils de l'analyse (logiciel exploité)	16
I.3.4. Application de la technique d'analyse d'images	17
I.4. Le thym : plante à huile essentielle	20
I.4.1. Historique	20
I.4.2. Classification	20
I.4.3. Caractères généraux.....	20
I.4.4. Intérêt médical	21
I.4.5. Espèce étudiée.....	21

Chapitre II. Etude du procédé de l'extraction de l'HE de *Thymus fontanesii*

II.1. Objectif du chapitre.....	23
II.2. Introduction.....	23
II.3. Travaux antérieurs	23
➤ Rendement en huile essentielle	24
➤ Caractéristiques physico-chimiques.....	24
➤ Composition chimique	25
➤ Techniques et procédés d'extraction des huiles essentielles	26
II.4. Matériels et méthodes.....	27
1) Matériel végétal.....	27
2) Extraction des huiles essentielles de <i>Thymus fontanesii</i>	27
2.1. Détermination du taux d'humidité de la matière végétale	28
2.2. Calcul du rendement de l'extraction	29
3) Optimisation des paramètres de l'extraction par hydrodistillation	29
4) Etude de la cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	31
5) Application de deux modèles à la cinétique sur les données la cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	31
6) Visualisation des poches sécrétrices de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> ...	31
7) Caractérisation de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	32
➤ Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	32
➤ Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	32
➤ Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	32
II.5. Résultats et discussions	33
1) Détermination du rendement de l'extraction de <i>T. fontanesii</i>	33
2) Optimisation des paramètres expérimentaux.....	34
2.1. Optimisation de la masse de la matière végétale	34
2.2. Optimisation du débit du condensat de la vapeur d'eau.....	34
2.3. Optimisation par le plan d'expérience	35
3) Etude de la cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i>	38
4) Application de deux modèles à la cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i>	45
5) Localisation des organes de sécrétion de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i>	50
6) Caractérisation de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i>	52
6.1. Caractéristiques organoleptiques et propriétés physico-chimiques	52
6.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i>	53
II.6. Conclusion	55

Chapitre III. Valorisation de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

III.1. Objectif du chapitre.....	57
III.2. Introduction.....	57
III.3. Travaux antérieurs	57
a) Activité biologique (activité anti-oxydante).....	57
b) Activités pharmacologiques	57

III.4. Matériels et méthodes.....	58
1) Animaux.....	58
2) Evaluation de l'activité anti-oxydante des l'huiles essentielles	59
➤ Evaluation de l'activité anti-oxydante par le 2,2- Diphenyl -1- picrylhydrazyl (DPPH)	59
➤ Evaluation de l'activité anti-oxydante par la méthode du pouvoir réducteur	59
3) Etude de la toxicité aiguë: détermination de la dose médiane (DL50) de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	60
4) Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de <i>Thymus</i> <i>fontanesii</i>	60
➤ Œdème de la patte induit par la Carragénine	60
➤ Œdème de l'oreille induit par le 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA).....	62
5) Evaluation de l'activité antiulcéreuse de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i>	63
➤ Analyse histologique	65
6) Evaluation de l'activité Antipyrétique	65
7) Analyse statistique	65
III.5. Résultats et discussions	66
1) Activité anti oxydante de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i>	66
1.1) Evaluation de l'activité anti oxydante de l'huile essentielle de <i>thymus</i> <i>fontanesii</i> par le DPPH	66
1.2) Evaluation de l'activité anti oxydante de l'huile essentielle de <i>thymus</i> <i>fontanesii</i> par la méthode du pouvoir réducteur	68
2) Evaluation de la toxicité aiguë: détermination de la dose médiane (DL50) de <i>T.</i> <i>fontanesii</i>	69
3) Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i>	69
3.1) Œdème de la patte induit par la Carragénine.....	69
3.2) Œdème de l'oreille induit par le 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)	71
4) Evaluation de l'activité antiulcéreuse de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	72
5) Activité antipyrétique de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	75
III.6. Conclusion.....	77

CHAPITRE IV. Activités biologiques de l'association des huiles essentielles

IV.1. Objectif du chapitre	78
IV.2. Introduction	78

IV.3. Travaux antérieurs	78
IV.3.1. Travaux antérieurs sur l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	78
➤ Techniques et procédés d'extraction.....	78
➤ Composition chimique	79
IV.3.2. L'huile essentielle de <i>Mentha piperita</i> L	79
➤ Composition chimique	79
IV.3.3. L'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	80
IV.3.4. Les activités biologiques des associations des huiles essentielles	81
IV.4. Matériels et méthodes	82
IV.4.1. Matériel végétal.....	82
IV.4.2. Matériels biologique.....	82
IV.4.3. Extraction des huiles essentielles	83
IV.4.4. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	83
IV.4.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles..	83
1) Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne.....	83
➤ Techniques en milieu solide: Méthode de l'aromatogramme.....	83
➤ Techniques en micro-atmosphère ou méthode en phase vapeur.....	84
2) Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou Technique des dilutions.....	85
IV.4.6. Combinaison des huiles essentielles	85
1) Effets résultants des combinaisons des huiles essentielles	85
IV.5. Résultats et discussions.....	86
IV.5.1. Détermination des rendements de l'extraction des huiles essentielles.....	86
1. Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de <i>C. sinensis</i>	86
2. Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de <i>M. piperita</i>	86
IV.5.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	86
IV.5.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	88
1) Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i>	88
➤ Pour la méthode de l'aromatogramme	88
➤ Pour la méthode de micro atmosphère.....	91
➤ Concentration minimale inhibitrice (CMI)	94
2) Activité antimicrobienne de la combinaison des huiles essentielles	95
IV.6. Conclusion	99

CHAPITRE V. Formulation d'une crème pharmaceutique

V.1. Objectif du chapitre.....	100
V.2. Introduction	100
V.3. Généralités sur les émulsions	100
V.4. Travaux antérieurs	101
V.4.1. Travaux antérieurs relatifs à l' <i>Aloe arborescens</i>	101
➤ Composition chimique	101
➤ Activité cicatrisante	103

V.4.2. Travaux antérieurs relatifs à l'activité cicatrisante de l'huile essentielle de thym	104
V.5. Matériels et méthodes.....	104
V.5.1. Matériel végétal	104
V.5.2. Médicament	104
V.5.3. Extraction du gel d' <i>Aloe arborescens</i>	105
V.5.4. Paramètres morphologiques des feuilles d' <i>Aloe arborescens</i>	106
V.5.5. Dosage des composés phénoliques totaux du gel d' <i>Aloe arborescens</i>	106
V.5.6. Evaluation de la miscibilité de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i> dans le gel d' <i>Aloe Arborescens</i>	106
V.5.7. Préparation des émulsions	107
V.5.8. Contrôle des caractéristiques macroscopiques et microscopiques	110
V.5.9. Etude de l'activité cicatrisante	111
V.5.10. Analyse statistique.....	112
V.6. Résultats et discussions	113
V.6.1. Evaluation des paramètres morphologiques des feuilles d' <i>Aloe arborescens</i> . ..	113
V.6.2. Concentration en composés phénoliques totaux du gel d' <i>Aloé arborescens</i> ..	113
V.6.3. Taux de miscibilité entre l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i> et le gel d' <i>Aloe arborescens</i>	114
V.6.4. Contrôle des émulsions et examen microscopique.....	114
V.6.5. Evaluation de l'activité cicatrisante.....	115
V.7. Conclusion.....	119
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	120
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	123
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

A: Absorbance

AFNOR : Association Française de normalisation

AG: Acide Gallique

ATCC : American Type Culture Collection

CFI : Concentration Fractionnelle Inhibitrice

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

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

COX: Cyclo-oxygénase

CV: Coefficient de variation

DL50 : Dose létale 50

DO : densité optique

DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle

DZI: Diamètre des Zones d’Inhibitions

Eq: Equivalent

F: Fraction extraite rapidement

Fig: figure

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

HD : Hydrodistillation

HE : Huile essentielle

HEs : Huiles essentielles

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

IR Indice de rétention

J : jours

K: Constante de vitesse

Kg : Kilogramme

M_C : Quantité de la matière végétale utilisée pour l’extraction

MH : Masse humide de la matière végétale.

M-H: Mueller Hinton

M_h: Quantité d’HE récupérée exprimée en g

M_i : Masse des feuilles initiales

Min : Minute

M_s : Masse des feuilles à la stabilisation du poids

MS: spectrométrie de masse (*Mass spectrometry*)

nm : nano mètre

R_{HE} : Rendement en huile essentielle

R_∞: Rendement maximal obtenu en huile essentielle

RGB: Red Green Blue

SAB : sabouraud

SM : Spectrométrie de Masse

T: Température

Tr : Temps de rétention

Y: Teneur en eau ou taux d'humidité

Y: Taux d'humidité de la matière végétale utilisée.

µg : Microgramme

µl: microlitre

µm: micromètre

% : Pourcentage

°C: degré Celcius

Liste des tableaux

Chapitre II

Tableau	Titre	Page
Tableau II.1	Localisation des principales espèces de thym en Algérie	24
Tableau II.2	Caractéristiques physico-chimiques de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i>	25
Tableau II.3	Composition chimique des HEs de quelques espèces de thym	25
Tableau II.4	Composition chimique des HEs de <i>Thymus fontanesii</i> récolté en Algérie	26
Tableau II.5	Niveaux des expériences du plan factoriel	30
Tableau II.6	Conditions opératoires des essais programmés et rendements R _{HE} en huile obtenus.	35
Tableau II.7	Analyse de la variance (ANOVA)	37
Tableau II.8	Constantes des deux modèles appliqués à la cinétique de l'extraction de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i>	47
Tableau II.9	Constantes des deux modèles	50
Tableau II.10	Valeur du facteur forme	50
Tableau II.11	Propriétés physico-chimiques de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i>	52
Tableau II.12	Composition chimique de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i>	54

Chapitre III

Tableau	Titre	Page
Tableau III.1	Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'HE de <i>T. fontanesii</i> obtenus par la méthode de l'œdème de la patte	70
Tableau III.2.	Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i> par la méthode de l'œdème de l'oreille induit par le TPA	71
Tableau III.3.	Effet de l'administration orale de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> sur les lésions gastriques induites par l'éthanol chez les rats Wistar	72
Tableau III.4.	Effet de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i> sur l'hyperthermie provoqué chez les rats.	76

Chapitre IV

Tableau	Titre	Page
Tableau IV.1	Composition chimique de l'HE de <i>Citrus sinensis</i>	87
Tableau IV.2	Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i>	89
Tableau IV.3	Etude quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de l'écorce de <i>C. sinensis seule</i> et en combinaison avec l'HE de <i>T. fontanesii</i> .	96
Tableau IV.4	Etude quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>M. piperita seule</i> et en combinaison avec l'HE de <i>T. fontanesii</i> .	96
Tableau IV.5	Résultats de la combinaison entre les HEs de <i>T. fontanesii</i> et de <i>C. sinensis</i>	97
Tableau IV.6	Résultats de la combinaison entre les HEs de <i>T. fontanesii</i> et de <i>M. piperita</i>	98

Chapitre V

Tableau	Titre	Page
Tableau V.1.	Structure chimique de quelques anthraquinones	102
Tableau V.2	Quantités des constituants utilisés dans la préparation des trois émulsions	108
Tableau V.3	Paramètres morphologiques des feuilles de <i>Aloe arborescens</i> et leur rendement en gel	113
Tableau V.4.	Degré de miscibilité entre le gel et l'HE (%)	114
Tableau V.5.	Evolution des surfaces des plaies (cm ²) au cours de la durée du traitement	116

Liste des figures

Chapitre I

Figure	Titre	Page
Figure I.1.	Structure de l'isoprène C ₅ H ₈	05
Figure I.2	Hydrodistillation à l'aide d'un système de type Clevenger	09
Figure I.3	Extraction des HEs par entraînement à la vapeur d'eau	10
Figure I.4	Evolution des températures de distillation de l'eau et de l'HE, ainsi que du mélange eau/ HE en fonction de la pression du milieu	11
Figure I.5	Cinétique de l'extraction des HEs des graines de Carvi obtenues par hydrodistillation	12
Figure I.6	Enchaînement des étapes pour l'analyse d'images	17
Figure I.7	Etapes de l'analyse d'images: (a) image de l'échantillon; (b) image 8BIT; (c) image binaire; (d) calcul des surfaces	19
Figure I.8	Thymus fontanesii (Image originale)	21

Chapitre II

Figure	Titre	Page
Figure II.1.	Montage utilisé pour l'extraction des HEs	28
Figure II.2	Evolution du rendement en HE en fonction de la masse de la matière végétale	34
Figure II.3	Evolution du rendement en HE en fonction de débit du distillat	35
Figure II.4	Diagramme de Pareto	36
Figure II.5	Diagramme des effets	37
Figure II.6	Surface de réponse estimée	38
Figure II.7	Evolution du rendement en HE en fonction de temps.	39
Figure II.8.	Evolution de la vitesse de l'extraction de l'HE de <i>T. fontanesii</i> en fonction du temps.	41
Figure II.9.	Chromatogrammes de l'HE récupérée pour chaque fraction	De 42 à 43
Figure II.10	Evolution du composé majoritaire (Carvacrol) en fonction du temps	44
Figure II.11.	Evolution de la vitesse de l'évolution du composé majoritaire «Carvacrol» en fonction du temps.	45
Figure II.12.1	Application du modèle du site unique à la cinétique d'extraction de l'HE	46
Figure II.12.2	Application du modèle de deux sites à la cinétique de l'extraction de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i>	47
Figure II.13	Application des deux modèles à la cinétique de l'extraction de l'HE	48
Figure II.14	Application des deux modèles à la cinétique de l'évolution du Carvacrol.	49
Figure II.15.	Feuilles de thym observées par microscopie électronique à balayage	51

Figure II.16.	Figure II.16. a) Poche sécrétrice observée par microscopie électronique à balayage b) Détection des contours de la poche sécrétrice et analyse de l'image	52
Figure II.17.	Chromatogramme de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i>	53

Chapitre III

Figure	Titre	Page
Figure III.1	Détermination des surfaces des pattes par analyse d'images	62
Figure III.2.	Détermination des surfaces des lésions ulcéreuses par traitement d'images	64
Figure III.3.	Evolution du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations	66
Figure III.4.	Evolution de l'absorbance en fonction des concentrations en huile essentielle et en BHT.	68
Figure III.5.	Aspect macroscopique de la muqueuse gastrique	74
Figure III.6.	Etude histologique de la muqueuse gastrique des rats	75

Chapitre IV

Figure	Titre	Page
Figure IV.1	Illustration de la méthode de l'aromatogramme	84
Figure IV.2	Illustration de la méthode de microatmosphère	84
Figure IV.3	Chromatogramme obtenu pour l'HE de la Menthe poivrée	88
Figure IV.4	Action antimicrobienne de l'HE de <i>Thymus. fontanesii</i> en aromagramme	90
Figure IV.5	Action antimicrobienne de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i> en micro atmosphère	92
Figure IV.6	Etude comparative entre les méthodes: aromagramme VS micro atmosphère	93

Chapitre V

Figure	Titre	Page
Figure V.1.	Les différents types classiques d'émulsion	101
Figure V.2.	<i>Photographie de l'Aloe arborescens</i>	104
Figure V.3	Les différentes étapes de l'extraction du gel de l'Aloe arborescens	105
Figure V.4.	Diagramme de l'élaboration des émulsions	109
Figure V.5.	Mesure de la surface des plaies	112
Figure V.6	Photographies prises au microscope optique des émulsions réalisées	115
Figure V.7.	Evolutions des pourcentages de réduction des plaies	117

Introduction Générale

L'homme a depuis longtemps, fait appel à certaines plantes pour se soigner. Ces plantes que l'on qualifie de médicinales sont utilisées empiriquement, comme remèdes contre plusieurs maladies.

Au sein de cette flore, certaines plantes présentent la caractéristique de produire une essence comme métabolite secondaire. Cette dernière, une fois extraite par l'homme par divers procédés, est dite huile essentielle. Si elle n'est que d'une utilité secondaire pour la plante, elle constitue une source naturelle de molécules bioactives.

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne des hommes qui les utilisaient autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture et même se soigner (Burt, 2004).

C'est à ce dernier aspect que nous nous intéressons dans ce travail pour valoriser les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et leurs constituants. Parmi ces derniers, de nombreux composés volatils sont utilisés comme ingrédients courants des préparations pharmaceutiques. Le thymol, par exemple, est employé pour les soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques ou encore l'eugénol pour ses propriétés analgésiques (Inouye and Abe, 2007). De même, les terpènes, ont montré des activités pharmacologiques remarquables. (Ouraïni et al., 2007).

L'usage immodéré et répétitif des médicaments a amené l'organisme humain à développer des résistances à leurs effets curatifs. Ces remèdes, comme les antibiotiques qui restent par ailleurs une invention majeure dans le domaine de la médecine, ont montré leurs limites et quelquefois des effets contraires aux buts recherchés.

Les essences naturelles présentent des activités biologiques remarquables. De nombreux auteurs se sont attachés à l'étude des propriétés thérapeutiques des huiles essentielles afin d'apporter de nouveaux remèdes aux maladies actuelles.

Dans ce contexte, nous allons valoriser l'huile essentielle d'une espèce de thym qui est le *Thymus fontanesii*. Cette plante aromatique et spontanée qui appartient à la famille des labiées est originaire d'Algérie.

L'huile essentielle du *Thymus fontanesii* a montré une variabilité dans sa composition chimique, selon la région géographique, les travaux de Bekhechi et al. (2007), ont montré que c'est le Carvacrol qui domine la composition de l'huile de la plante récoltée dans la région de

Tlemcen (Algérie), par contre, la plante récoltée dans les régions de Djelfa et Sétif (Algérie) a montré une composition dominée par le Thymol (Dob et al., 2006).

Ainsi le premier objectif de ce travail sera la valorisation et la caractérisation de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii* récoltée dans les montagnes de Médéa (Algérie).

En aromathérapie, le principe d'associer plusieurs extraits de plantes est une technique de pointe (Aguilar-González et al., 2015). Il s'agit de coupler plusieurs huiles essentielles ou extraits aux propriétés thérapeutiques complémentaires pour obtenir un spectre d'action total aux vertus similaires et en amplifier le résultat.

C'est de ce principe que découle le deuxième objectif de ce travail, évaluer les activités thérapeutiques de l'huile essentielle du *Thymus fontanesii* combinée à d'autres huiles ou extraits de plantes.

Comme l'étude des activités biologiques nécessite un mélange d'huiles homogène, nous allons proposer une méthode simple, utilisant la technique d'analyse d'images pour la détermination de la miscibilité de la solution à valoriser.

Cette étude sera présentée sous forme de cinq chapitres ;

Le premier chapitre est théorique, il regroupe des généralités sur les huiles essentielles, une description de la technique d'analyse d'images et des généralités sur le thym.

Le deuxième chapitre sera consacré à l'extraction et à la caractérisation de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* (Optimisation des paramètres de l'extraction, application de deux modèles à la cinétique de l'extraction et la détermination de la composition chimique de l'huile extraite dans les conditions optimales).

Le troisième chapitre sera dédié à l'évaluation des activités biologiques et pharmacologiques de cette huile essentielle (Activité antioxydante, anti-inflammatoire, antiulcéreuse et antipyrétique).

Le quatrième chapitre déterminera une nouvelle méthode de calcul du taux de miscibilité de deux liquides de composition complexes. Il s'agit du mélange huile essentielle de thym/

huile essentielle d'orange douce pour la première association et le mélange huile essentielle de thym/ huile essentielle de la menthe poivrée pour la seconde association.

Par cette méthode de calcul inédite; il pourra être déterminé les proportions idoines des deux huiles dans le mélange a même d'obtenir la meilleure homogénéité.

L'activité antimicrobienne des deux associations d'huiles essentielles dans les proportions précédemment obtenues sera évaluée et comparée à celle de chaque huile prise individuellement.

Le dernier chapitre sera centré sur la proposition d'une forme pharmaceutique. En effet, trois variantes de crème seront réalisées. La première à base de l'huile essentielle de *Thymus. fontanesii*, la deuxième à base du gel d'une *Aloe* qui est l'*Aloe arborescens* et la troisième comprend l'association huile essentielle de *Thymus. fontanesii* et le gel de l'*Aloe arborescens*. Ces variantes de crème permettront d'évaluer l'activité cicatrisante de chaque huile individuellement ainsi qu'en combinaison.

Nous terminerons par une conclusion, qui va apprécier l'ensemble des résultats acquis lors de cette étude.

Chapitre I. Partie bibliographique

I.1. Introduction

Produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles (HEs) sont utilisées comme produits aromatisants en parfumerie, en industrie cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire, en aromathérapie et en industrie alimentaire (Burt, 2004).

Les HEs sont des mélanges liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie: l'aromathérapie.

Dans ce chapitre nous allons exposer des généralités sur les HEs et deux procédés de distillation de leur extraction, nous allons décrire également, la cinétique de cette extraction et les modèles qui peuvent la décrire. De même, nous allons donner, un aperçu sur la technique de l'analyse d'images qui sera utilisée pour le traitement de nos résultats expérimentaux. Nous allons terminer par un bref descriptif de la plante de base utilisée dans cette étude qui est une espèce de thym.

I.2. Généralités sur les huiles essentielles

I.2.1. Définition d'une huile essentielle

L'association française de normalisation (AFNOR) définit une HE comme étant un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'HE est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques. (AFNOR, 2000). Cette définition est restrictive car elle exclut aussi bien les produits extraits à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé.

Le terme «huile» s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme «essentielle» fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (Anton et Lobstein, 2005).

I.2.2. Localisation des huiles essentielles

La synthèse et l'accumulation d'une HE sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, le plus souvent situées sur ou à proximité de la surface du végétal (Bruneton, 1987).

Les HEs peuvent être stockées dans tous les organes végétaux: fleurs (bergamotier, tubéreuse), mais aussi dans les feuilles (eucalyptus, citronnelle) et bien que ce soit moins habituel, dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), des rhizomes (curcuma, gingembre), des fruits (anis), des graines (muscade) (Bruneton, 1993).

I.2.3. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique d'une HE est très complexe (Bruneton, 1995 et Arnaud, 1985). En effet, le nombre de composés isolés est d'environ un millier et il en reste encore beaucoup à découvrir (Belaiche, 1979). Les HEs sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts, il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

1. Les composés terpéniques

Les terpènes doivent leur nom à Kekulé (ter=térébenthine; pène=pin). Ce sont des composés formés de l'assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques (2-méthylbuta-1,3-diène), unité composée de cinq carbones isopréniques, Figure I.1 (Capon et al., 1993).

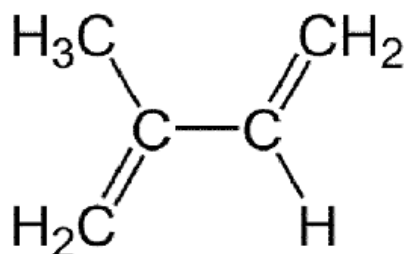


Figure I.1. Structure de l'isoprène (C₅H₈) (Bakkali et al., 2008).

Selon Bruneton (1995, 1999) seuls les terpènes les plus volatils dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée (monoterpènes et sesquiterpènes) sont rencontrés dans la composition des huiles essentielles.

Ils constituent entre autre le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones. Extraites, ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande).

➤ Monoterpènes

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les HEs (90%). Ils comportent deux unités isoprène (C₅H₈), selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acycliques (Myrcène, Ocimène) ou cyclique; monocycliques (p-Cymène, (Terpinène) ou bicycliques (Camphène, Sabinene, Pinènes, 3-Carène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales (Bruneton, 1995).

➤ **Sesquiterpènes**

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature.

2. Composés aromatiques

Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Cette classe comporte des composés odorants dont la biogenèse est différente de celle des terpènes (Bruneton, 1999). Parmi ces divers composés aromatiques, on peut citer les aldéhydes (anisiques, cuminique, cinnamique), les phénols et éthers (thymol, eugénol, anéthol) et les coumarines (bergapteine, ombellifère).

Des composés acycliques tels que les acides organiques à faible poids moléculaire (acétique, formique, valérique) peuvent être également rencontrés.

Ils sont davantage fréquents dans les HEs d'Apiaceae (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon, etc...

I.2.4. Techniques d'analyse des huiles essentielles

Les techniques d'analyse ont pour but de déterminer la composition d'un échantillon et de doser les éléments le constituant. Elles existent depuis longtemps mais, elles ont considérablement progressé depuis le développement de l'informatique et de l'électronique. Aujourd'hui, les méthodes d'analyse sont beaucoup plus accessibles grâce à des logiciels fonctionnels donnant des informations directement exploitables même, par des personnes non spécialistes.

L'étude de la composition chimique d'une HE est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des HE (Tomi et al., 2006)

➤ **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La chromatographie est une puissante technique de séparation qui trouve de nombreuses applications dans tous les domaines de la science (Skoog et al, 2003).

Réalisée expérimentalement en 1952 par James et Martin, la CPG s'est montrée une

méthode des plus appropriées à la séparation et à l'identification des constituants des HEs, particulièrement avec la programmation de la température. Elle permet à la fois l'analyse qualitative et quantitative (Paris et Godon, 1979).

En CPG, l'échantillon est injecté et vaporisé au sommet de la colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. A la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur; lorsqu'un constituant de l'échantillon le traverse, un pic apparaît sur l'enregistreur (Skoog *et al.*, 2003).

Après la séparation par chromatographie, les pics des échantillons doivent être identifiés. Ils sont définis par l'injection des étalons purs et par des données de rétention.

Les indices de rétention ont été introduits par Kovats, ils constituent pour chaque substance une grandeur de rétention assez reproductible. Ils sont calculés à partir d'une gamme d'alcane.

L'identification consiste en la comparaison des indices de rétention à ceux des étalons purs injectés parallèlement. Cependant, l'utilisation d'étalons et d'indices de rétention pour une analyse qualitative et quantitative des échantillons étudiés limite l'efficacité de la CPG (les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre) et impose son couplage avec d'autres méthodes telles que la spectrométrie de masse. Cette dernière a la capacité d'identifier un très grand nombre de composés présents dans le mélange à analyser. Actuellement elle représente le couplage le plus utilisé dans divers secteurs (agroAlimentaire, biochimie, ...) (Tranchant, 1995).

➤ Spectrométrie de masse (SM)

Selon Skoog *et al.* (2003), la spectrométrie de masse est parmi toutes les techniques analytiques, celle dont le domaine d'application est le plus étendu. En effet, elle peut fournir des informations concernant la composition élémentaire d'un échantillon; La structure des molécules inorganiques, organiques et biologiques; la composition qualitative et quantitative des mélanges complexes, etc ...

Une analyse par SM comprend les étapes suivantes;

- Atomisation de l'échantillon ;
- Conversion d'une fraction importante des atomes formés pendant la première étape en ions (habituellement porteur d'une seule charge positive) ;
- Séparation des ions formés à la deuxième étape sur la base du rapport de leur masse à leur charge ;
- Détermination de la population d'ions de chaque espèce par comptage ou par mesure du courant résultant de l'arrivée des ions à un transducteur adéquat. Ce dernier convertit le

faisceau d'ions en un signal électrique qui peut être traité et stocké dans la mémoire d'un ordinateur.

➤ **Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)**

Au cours de ces dernières années, les avancées obtenues dans ces domaines d'analyse tiennent principalement à deux raisons: dans le domaine de la séparation chromatographique et, en particulier, de la CPG, au développement de colonnes chromatographiques capillaires à très haute résolution; dans le domaine de la détection, au développement en routine des techniques de couplages, de séparations chromatographiques avec la détection par SM.

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe en déclenchant un processus à plusieurs étapes (De Hoffmann et al., 1999);

❖ Ionisation: les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de départ.

❖ Accélération: les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.

❖ Séparation: les ions seront distribués selon leur rapport masse / charge.

❖ Détection: après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.

❖ Traitement du signal: le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leur masse/ charge.

L'appareillage CG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondant à chaque pic chromatographique, ce qui rend possible l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG et ceci en comparant les indices de rétention (I_r) et les spectres de masse obtenus avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées. C'est donc une technique de pointe permettant la connaissance d'échantillons parfois complexes en un temps très court.

I.2.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des HEs de la matière végétale peut être réalisée au moyen de divers procédés, basés sur des techniques classiques: Distillation, Expression, Enfleurage ou alternatives (récentes): extraction par micro-ondes ou par ultrasons.

En effet, de nouvelles techniques permettant d'augmenter le rendement de production et réduire le temps de l'extraction ont été développées, comme l'extraction par ultrasons ou par micro-ondes. (Lagunez-Rivera, 2006 ; Ferhat et al., 2007; Sahraoui et al., 2008).

1. Hydrodistillation ou distillation à l'eau

L'hydrodistillation est la méthode la plus couramment employée pour l'extraction d'une HE. Le procédé consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est porté à ébullition. Sous l'effet de la chaleur, les molécules odorantes contenues dans les glandes sécrétrices des végétaux sont libérées et entraînées mécaniquement avec la vapeur d'eau. Le refroidissement par condensation conduit à la séparation du mélange eau-HE par décantation. Ainsi, par différence de densité, l'eau et les molécules volatiles sont séparées en une phase aqueuse (hydrolat) et une phase organique surnageant (HE). (Bruneton, 1999).

Le système «Clevenger» (Figure I.2), préconisé par la Pharmacopée Européenne (Pharmacopée Européenne, 1997), permet le recyclage de la phase aqueuse du distillat dans le bouilleur par cohobage (Clevenger, 1928).

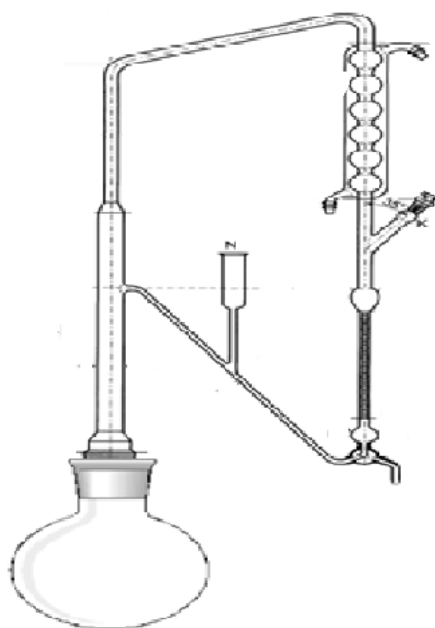


Figure I.2. Hydrodistillation à l'aide d'un système de type Clevenger (Sutour, 2010).

L'hydrodistillation reste la méthode la plus utilisée du fait qu'elle soit facile à mettre en œuvre.

2. Entraînement à la vapeur d'eau

A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (Figure I.3). Ce procédé consiste à récupérer l'HE des plantes en faisant passer à travers ces dernières un courant de vapeur d'eau. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel végétal, les cellules éclatent et libèrent l'HE qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange «eau + HE». Ces vapeurs saturées en composés organiques volatils sont condensées et récupérées par décantation.

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'HE (Meyer-Warnod, 1984).

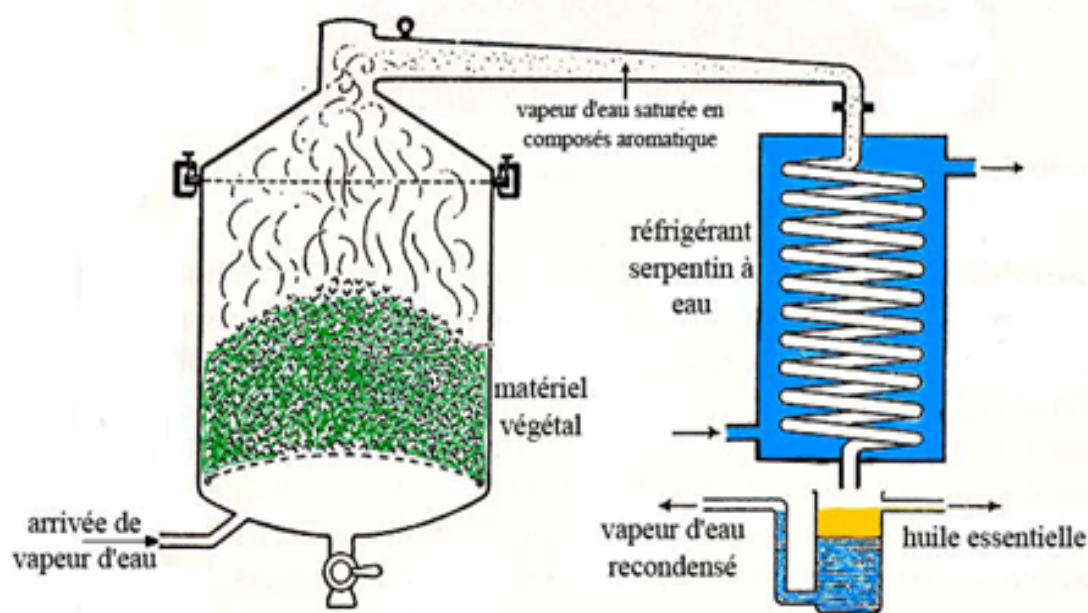


Figure I.3. Extraction des HEs par entraînement à la vapeur d'eau (Lucchesi, 2005)

- **Principe d'obtention des huiles essentielles par distillation**

La température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation. Elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange «eau + HE» distille à une température inférieure à 100°C à pression atmosphérique. Par contre, les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart plus élevées. (La

figure I.4) montre l'évolution de la température de co-distillation d'un mélange hétérogène d'eau et d'HE.

Pendant la distillation, les liquides immiscibles semblent distiller simultanément comme à partir de deux compartiments séparés, bien qu'en pratique, ils soient mêlés. Leurs vapeurs constituent un gaz homogène, on parle de co-distillation.

La durée de la co-distillation dépend principalement de la tension de vapeur des composés aromatiques. Or celle-ci est très variable: relativement élevée pour les hydrocarbures monoterpéniques (environ 70 mmHg pour le limonène à 100°C) mais faible pour les sesquiterpènes (10 mmHg pour la carvone à 100 °C). En conséquence, les premiers co-distillent rapidement alors que la présence de certains composés de faible tension de vapeur rend les HEs plus difficilement à distiller (Lagunez Rivera, 2006)

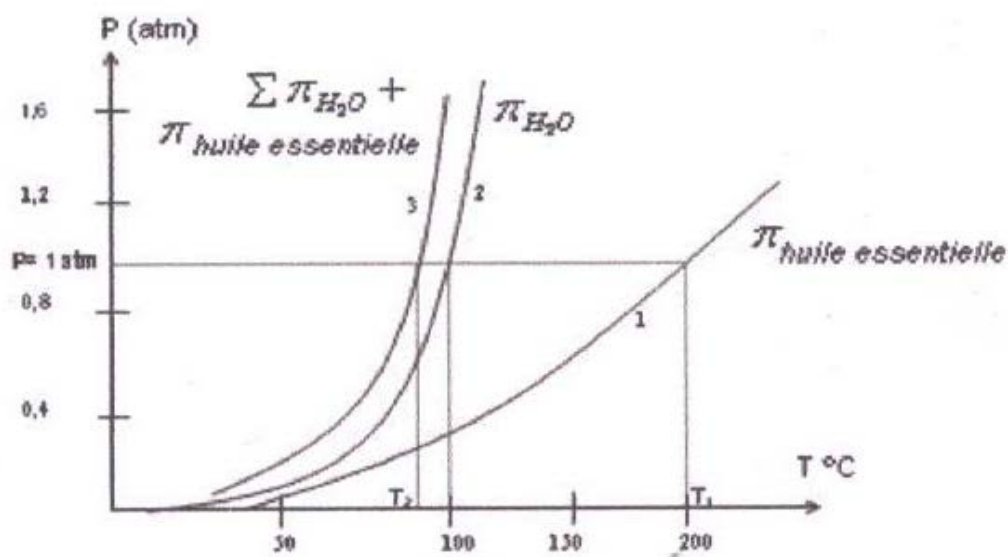


Figure I.4: Evolution des températures de distillation de l'eau et de l'HE, ainsi que du mélange eau/ HE en fonction de la pression du milieu (Lagunez Rivera, 2006).

D'une façon générale, la production des HEs peut être assimilée à une combinaison de trois processus: (Lagunez Rivera, 2006)

- L'extraction proprement dite, conduisant au relargage des composés volatils dans le milieu aqueux sous l'action physique qu'exerce le gonflement de la matière végétale (phénomènes d'absorption d'eau ou osmotiques) via la pression interne, et de l'action chimique exercée par l'eau;

- La co-distillation eau/composés odorants;
- La séparation de l'HE des condensas impliquant la décantation (L'isolement des composés volatils après leur distillation est déterminé par leur degré de solubilité dans l'eau).

I.2.6. Cinétique de l'extraction des huiles essentielles

Les cinétiques de l'extraction des HEs sont caractérisées par plusieurs étapes; qui dépendent de l'emplacement des organes sécréteurs des HEs, elles se terminent par un palier définissant la fin de l'extraction. Un exemple de cinétique de l'extraction des HEs est illustré par la Figure I.5.

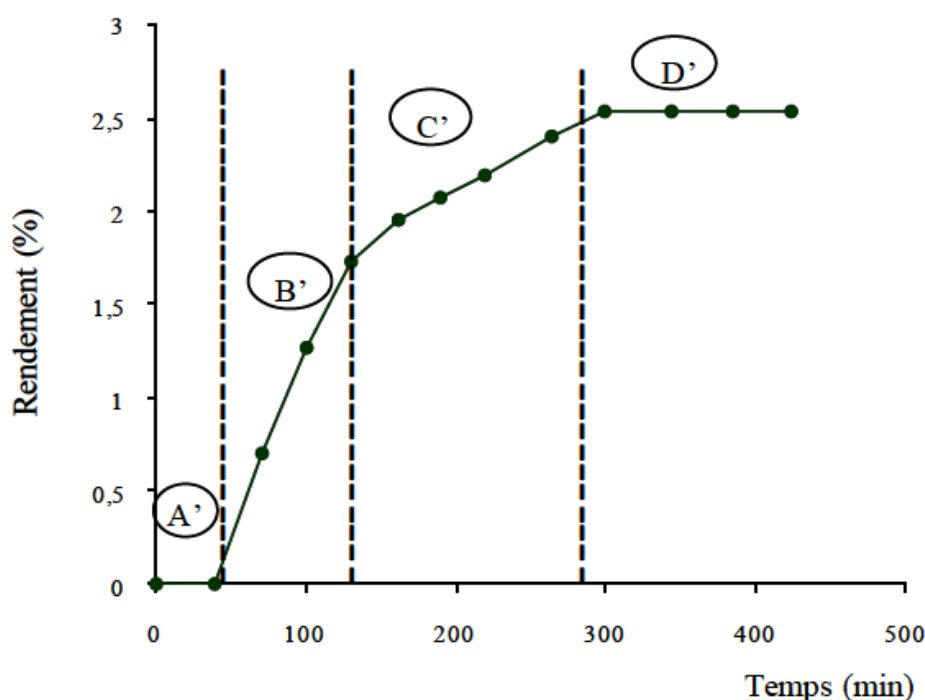


Figure I.5: Cinétique de l'extraction des HEs des graines de Carvi obtenues par hydrodistillation (Farhat, 2010).

On distingue, quatre phases dans l'analyse de la courbe de la cinétique de l'extraction de l'HE des graines de Carvi, (Farhat, 2010)

- La première partie (phase A') est relative au chauffage de la matrice végétale qui correspond à la montée en température au sein du réacteur, étape durant laquelle aucune extraction d'HE ne se produit.
- La seconde phase (phase B') correspond à une droite représentant une extraction plus ou moins rapide de l'HE (environ 70 %).

- Au cours de la troisième phase (phase C') la courbe tend vers une droite croissante, qui correspond à environ 94.5% du rendement.
- Enfin, au cours de la dernière phase (phase D'), la courbe tend vers un palier, qui correspond au rendement maximum susceptible d'être atteint.

I.2.7. Application de modèles à la cinétique de l'extraction des huiles essentielles

La modélisation de la cinétique de l'extraction des HEs à partir d'un solide d'origine végétale permet de comprendre les mécanismes qui peuvent se produire au sein de ces végétaux.

L'extraction solide liquide est un processus de transfert d'un ou de plusieurs solutés d'un solide vers un fluide adjacent qui correspond au solvant d'extraction.

Deux modèles ont été proposés afin de décrire la cinétique de l'extraction des HEs, le modèle à un site et celui de deux sites de désorption.

➤ **Modèle cinétique à un site de désorption**

Ces modèles supposent que l'extraction est limitée seulement par la vitesse de désorption du composé de la matrice et non par la diffusion moléculaire, régie par le modèle reposant sur le coefficient thermodynamique de partage.

Adopté par Anekpankul et *al.* (2007), ce premier modèle considère l'existence d'un seul site avec une vitesse constante régie par l'équation I.1, de l'état quasi-stationnaire;

$$k_0 = \frac{1}{10} * \left(\ln \left(\frac{R_\infty}{R_\infty - R(t)} \right) \right) \quad (\text{I.1})$$

(Equation d'ordre 1), qui après dérivation conduit à l'expression de l'équation I.2:

$$\frac{R(t)}{R_\infty} = 1 - \exp(-k t) \quad (\text{I.2})$$

Avec;

R (t): Rendement obtenu après un temps t

R_∞: Rendement maximal obtenu

k₀: Constante de vitesse à l'étape initiale

t: Temps

Notant, comme hypothèses, que le composé est initialement distribué d'une manière uniforme dans la matrice et que, dès que commence l'extraction, la concentration du composé sur les surfaces de la matrice est égale à zéro (aucune limitation de solubilité). L'HE est considérée comme un soluté unique (bien qu'il soit en réalité un composé de grande variété de constituants). Les particules solides sont assimilées à des formes sphériques.

Chen et Spiro. (1994) ont tenté de leur côté de modéliser l'extraction par micro-ondes de métabolites secondaires à partir des feuilles de menthe et de romarin en se basant sur l'équation de l'état quasi-stationnaire. Les résultats obtenus se sont écartés nettement des données expérimentales.

➤ **Modèle cinétique à deux sites de désorption**

Le modèle à deux sites est une simple modification du modèle à un site de désorption qui décrit l'extraction qui se produit à partir de deux phases; la partie «rapide» et la partie «lente». Dans un tel cas, une certaine fraction F (aisément accessible) avec une grande vitesse de désorption et définis par k_1 , et la fraction restante $1 - F$ (difficilement extractible) avec une faible vitesse de désorption et défini par k_2 (Kim et Mazza, 2007). Ce modèle a la forme suivante donnée par l'équation I.3.

$$\frac{R(t)}{R_{\infty}} = 1 - [F \exp(-k_1 t)] - [(1 - F) \exp(-k_2 t)] \quad (\text{I.3})$$

Dans lequel k_1 est la constante de vitesse de premier ordre décrivant la fraction rapidement libérée (min^{-1}) et k_2 est la constante de vitesse de premier ordre décrivant la fraction libérée lentement (min^{-1}).

D'après Kubàtovà et al. (2002) l'extraction par fluide supercritique tend généralement à s'effectuer en deux étapes distinctes: la première, appelée étape rapide, concerne la masse du composé faiblement attaché à la matrice et la seconde, appelée étape lente, est associée à la masse du composé fortement liée à la matrice. Ils ont constaté également que le modèle des deux sites, basé sur la cinétique, décrit parfaitement l'extraction des composés d'HEs à partir de la Satura savory (*Satureja hortensis*) à l'aide d'un fluide supercritique (CO_2). D'autre part, le modèle basé sur le coefficient thermodynamique de partage ne satisfait pas l'allure d'extraction de ces composés et des hydrocarbures polyaromatiques (HPAs) par fluide supercritique.

Par ailleurs, les résultats obtenus par Chemat et al. (2005) lors de l'étude du modèle des deux sites montrent que celui-ci peut décrire parfaitement les méthodes d'extraction par

micro-ondes utilisées pour deux métabolites secondaires (carvone et limonène) à partir des graines de carvi.

Dans une autre étude, Desai et al. (2014) ont optimisé et modélisé le phénomène de l'extraction de l'HE de citrus (*C. flexuosus* (Steud.) Wats) par hydrodistillation. Les résultats obtenus par ces auteurs ont révélé que le modèle à deux sites de désorption était capable de décrire la cinétique de l'extraction.

Afin d'appliquer ces deux modèles, les fonctions pré-introduites dans le logiciel *Microcal Origin* ont permis d'adapter nos données expérimentales à ce modèle et d'en tirer les constantes.

I.3. Technique de l'analyse d'images

I.3.1. Description d'une image

Qu'est-ce qu'une image ?

Une image est une représentation numérique (x,y) d'un état réel, elle est constituée d'un ensemble de pixels. Le nom pixel provient de l'expression anglaise «*picture element*», qui signifie «élément d'image». Le pixel représente ainsi le plus petit élément constitutif d'une image numérique.

Les pixels composant une image possèdent une valeur correspondant à une teinte. Il existe trois types d'images;

- Les images binaires. Les plus simples, seulement deux couleurs sont possibles, noir ou blanc (valeur 0 ou 1).
- Les images en teinte de gris. Ce type d'image peut contenir un maximum de 256 'gris' différents (valeur de pixel allant de 0 à 255).
- Les images couleurs. Ce sont les plus complexes,

Dans le cas d'une image binaire, chaque pixel correspond à un point. En revanche, une image couleur est décomposée en 3 composantes, R(Red), G(Green) et B(Blue). Pour chaque pixel, le codage de la couleur est représenté par trois valeurs, chacune codée sur un octet (de 0 à 255).

I.3.2. Etapes de l'analyse des images

La technique de l'analyse d'images peut se résumer comme l'aboutissement de trois étapes de travail, lesquelles partagent certains outils.

La première étape regroupe ce qu'on peut appeler les *prétraitements*. Ils ont pour but de corriger les défauts grossiers observés dans l'image pour obtenir des images sur lesquelles il sera plus simple de travailler. Cette phase englobe l'étape de transformation des images en niveaux de gris.

La seconde étape est la *segmentation*. C'est une étape optionnelle puisqu'elle dépend des méthodes d'analyse que l'on souhaite appliquer. En effet, elle est inutile si l'analyse a lieu directement sur une image en niveau de gris alors qu'elle sert de prétraitement aux méthodes d'analyse d'images labellisées. Une image labellisée est une image partitionnée en ensembles connexes de pixels. La segmentation par seuillage s'appuie sur l'hypothèse que les objets peuvent être distingués du fond ou entre eux par leurs niveaux de gris.

Enfin, la dernière étape est l'*analyse* proprement dite. C'est la phase sur laquelle nous allons porter nos efforts. Une fois l'image prétraitée, on peut vouloir mesurer des tailles de particules, reconnaître des formes, discriminer des images ou encore caractériser une texture.

Les outils de traitement disponibles sont très nombreux. Une part du travail de l'analyste est donc de faire le choix des outils adaptés puis de les ajuster aux images qu'il doit traiter.

I.3.3. Les outils de l'analyse (logiciel exploité)

Afin d'obtenir, à partir des images, des données quantitatives, différents logiciels d'imagerie peuvent être employés. Parmi ces logiciels, une distinction peut être faite pour le logiciel générique ImageJ (Huth et al., 2011).

ImageJ® est un logiciel de traitement d'images qui offre de nombreuses fonctionnalités telles que le filtrage, seuillage, la détection des contours, mais qui nécessite la connaissance du langage de programmation (basé sur Java).

ImageJ est un logiciel développé par Wayne Rasband à la US National Institutes of Health (NIH) en 1997, à l'origine comme un substitut à son prédécesseur, NIH-Image, qui était uniquement disponible pour la plate-forme Apple Macintosh. En portant NIH-Image en Java, ce logiciel deviendra ImageJ.

L'étrange J de ImageJ provient du langage de programmation Java dans lequel ImageJ est écrit. Java se présente comme un excellent langage pour l'imagerie, rapide, régulier dans sa structure, capable de manipulations graphiques.

A ce jour, l'ImageJ reste un des meilleurs logiciels Open Source particulièrement adapté aux applications en biologie et en médecine. À titre d'exemple, ce logiciel est utilisé dans le domaine de la chirurgie dentaire afin de mesurer les surfaces des lésions gingivales (Kerner et

al. 2007). Aussi, dans le domaine de la biologie, il est utilisé pour l'analyse histopathologique afin de caractériser les altérations histopathologique (Sidahmed et al., 2015).

I.3.4. Applications de la technique d'analyse d'images

L'analyse d'images comprend la préparation de l'échantillon, l'obtention d'une image, son traitement et l'analyse des résultats (Mahdi et al., 2016). La figure I.6 représente le modèle du procédé de traitement des images, depuis l'acquisition des images jusqu'à l'obtention des mesures.

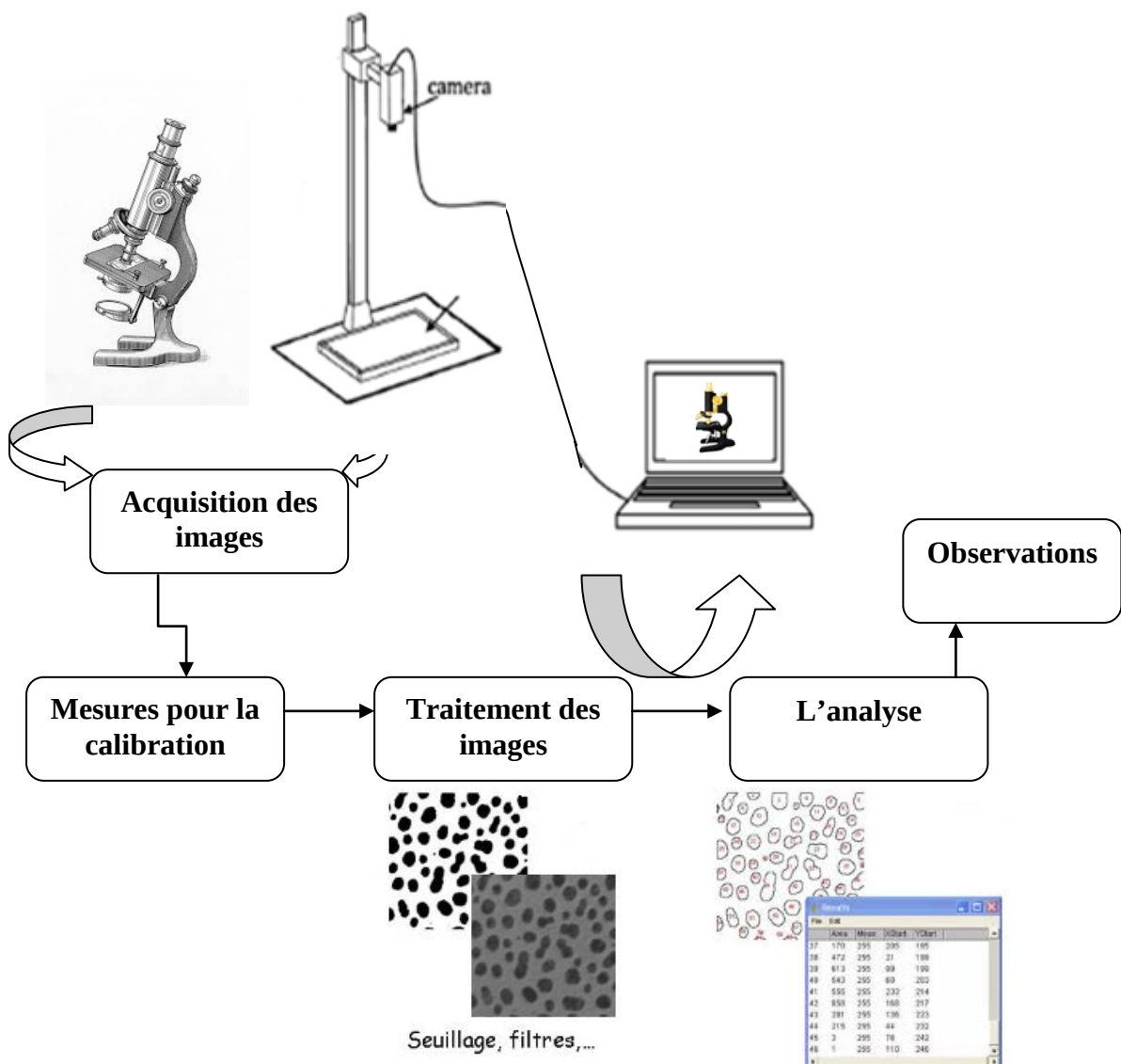


Figure I.6. Enchaînement des étapes pour l'analyse d'images

En pratique, la préparation des échantillons est différente suivant que les objets sont sous forme sèche ou en phase liquide. Une image nette doit ensuite être obtenue par le choix du

grossissement et de la luminosité adaptés. Des informations quantitatives peuvent être extraites de ces images à l'aide de logiciels d'analyse.

Les grandeurs obtenues sont diverses. On peut mesurer des surfaces, un diamètre moyen correspondant à la moyenne des diamètres obtenus dans différentes directions et calculer un diamètre de disque équivalent en surface projetée. Ces informations, devenues des données, peuvent alors être manipulées, stockées et comparées avec les résultats d'autres expériences.

Il est à noter que pour chacune des photographies, on dispose d'une échelle de référence afin de convertir les pixels en mm grâce au logiciel ImageJ. Pour les images prises par le microscope, une lame graduée se trouve positionnée dans le plan de l'image.

Pour les particules de formes très irrégulières impliquées dans des procédés où la forme joue un rôle important, il est nécessaire d'affiner la description granulométrique à l'aide d'un paramètre unique, mais en lui attribuant des paramètres supplémentaires qui tentent de quantifier dans quelle mesure l'objet étudié s'éloigne de la sphère modèle: ce sont les facteurs de forme. Parmi les facteurs de forme, on cite le facteur de Sphéricité.

- **Facteur de Sphéricité**

La mesure de la sphéricité est largement utilisée dans l'analyse d'image pour trier ou identifier des objets.

C'est un paramètre qui détermine le taux de sphéricité d'une particule selon la formule donnée par l'équation I.4:

$$Sphéricité = 4\pi \frac{Surface}{Périmètre^2} \quad (I.4)$$

La valeur 1.0 de la sphéricité indique un cercle parfait, en approchant la valeur 0.0 la sphéricité tend à indiquer de plus en plus un polygone allongé.

En résumé, le diamètre d'un objet de forme quelconque n'a pas de sens en lui-même et il faut toujours préciser à quel type de diamètre équivalent on se réfère. La description des particules irrégulières s'éloignant notablement de la sphère idéale et peut être précisée en introduisant un facteur de forme. (Ballard et Brown, 1982).

- **Exemple d'application**

- a. **Formation de l'image numérique**

L'image réelle de l'échantillon est transformée par la caméra d'un appareil photo ou d'un microscope optique vers une image numérique. Cette dernière est constituée de pixels contenant chacun une information (Figure I.7 (a)).

b. Transformation de l'image couleur (Red Green Blue (RGB)) en une image 8 bit (niveau de gris)

L'image obtenue est une image couleur (RGB). A l'aide du logiciel on l'a transformé en une image 8 bit (Figure I.7 (b)).

c. Transformation de l'image numérique en une image binaire

On sépare les structures intéressantes des autres par l'opération de seuillage. Cette étape est représentée par la figure I.7 (c).

d. Traitement de l'image binaire

A l'aide des fonctions multiples prédéfinies du logiciel ImageJ®, on peut calculer des surfaces. (Figure I.7 (d)). On sait qu'une image numérique est constituée d'un nombre de pixels. Ces derniers ont une longueur égale à leur largeur (forme carré). Ce logiciel fait la somme de ces carrés à l'aide d'un calculateur. A la fin de l'opération, on obtiendra la valeur de la surface totale des carrés, ce qui équivaut à la surface totale des gouttelettes.

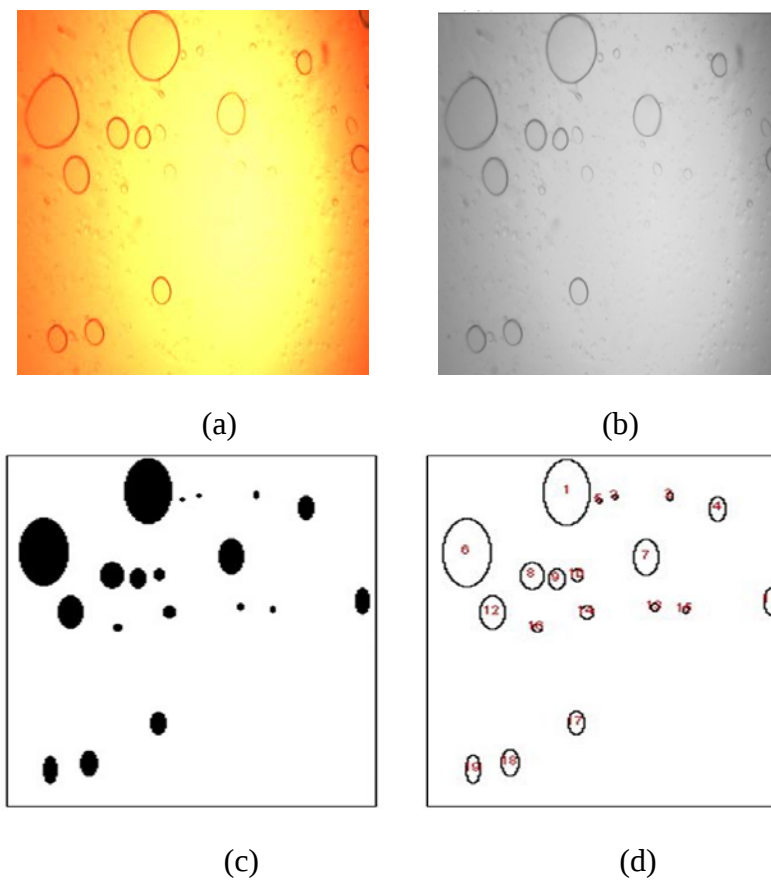


Figure I.7. Etapes de l'analyse d'images: (a) image de l'échantillon; (b) image 8BIT; (c) image binaire; (d) calcul des surfaces.

I.4. Le thym: plante à huile essentielle

I.4.1. Historique

Le thym est une des plantes aromatiques les plus employées en thérapeutique depuis les temps les plus anciens. Il a toujours accompagné la vie quotidienne des humains, tant pour ses usages médicaux et cosmétiques que culinaires. (Boukhatem et al., 2014).

Les sumériens et les égyptiens de l'antiquité l'utilisaient pour embaumer leurs morts (processus de momification). Chez les romains, on faisait brûler du Thym pour purifier l'air et éloigner les animaux nuisibles.

Le nom «Thym» provient du mot Grec «*Thymos*» qui veut dire odeur, et à ce titre le Thym est très largement utilisé en qualité de plante aromatique, en particulier dans la cuisine méditerranéenne en tant que condiment (Richard, 1985).

I.4.2. Classification

Le Thym appartient à la famille des Lamiacées appelée aussi Labiacées. C'est l'une des familles botaniques les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antioxydant et antibactérien. Elle regroupe entre 200 et 250 genres et entre 3200 et 6500 espèces (Dob et al., 2006).

Les labiacées sont des plantes à fleurs présentant 4 étamines et une symétrie bilatérale: les pétales ressemblent à deux lèvres, d'où le nom de Labiacée (*Labium* signifie lèvre en latin). *Thymus* est l'un des huit genres les plus importants par rapport au nombre d'espèces chez la famille des Labiacées (Morales, 1997).

I.4.3. Caractères généraux

Le thym est un sous-arbrisseau plutôt rampant, de couleur grisâtre dont les tiges minces et ligneuses supportent de minuscules feuilles roulées sur les bords, étroites et grisâtres. Poussant par paire, elles sont ovales, luisantes, de 6 à 12 mm. Au printemps, de minuscules fleurs d'un mauve rosé ou blanches éclosent en épis aux aisselles des feuilles, parfois aux sommités et donnent naissance à de petites graines rondes. Cette plante sous ligneuse érigée ou prostrée, est odorante de taxonomie complexe et polymorphe.

En raison de leurs extrêmes variabilités estimées de 350 espèces dont 60 sont en Europe et des hybridations interspécifiques, la détermination des espèces reste une tâche très délicate, particulièrement chez les espèces Algériennes à feuilles linéaires (Quezel et Santa, 1963).

I.4.4. Intérêt médical

Thymus veut dire «parfumer», à cause de l'odeur agréable que la plante dégage, les feuilles sont riches en HE dont les propriétés sont employées en phytothérapie. Au XIV^{ème} siècle, pendant la propagation de la peste noire importée des indes, pour se protéger contre le mauvais air, on portait des masques à bec remplis de plantes aromatiques tels que le thym (Delaveau. 1982).

Le thym est très antiseptique et est utilisé à ce titre pour soigner les infections pulmonaires. Il est spasmolytique et calme les toux. Il est actif sur la rhinorrhée car il diminue les sécrétions nasales. Mise à part son activité pulmonaire, le thym s'utilise aussi contre les problèmes intestinaux, il soigne les ballonnements. Son action antiseptique s'exerce également sur le système digestif et notamment en cas de diarrhée.

I.4.5. L'espèce étudiée

Le *Thymus fontanesii*, objet de notre étude, est une plante aromatique, spontanée appartenant à la famille des labiées et originaire d'Algérie et de Tunisie.

Appelée communément *Zaâteur* par les populations locales, la plante entière est très utilisée en médecine traditionnelle.

Le *Thymus fontanesii* est un sous arbrisseau à tiges dressées et robustes, à feuilles oblongues- lancéolées, entières et glabres, de 10 à 12 mm de long et à fleurs blanches ou pales à peine plus longues que le calice. Ses petites fleurs sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet d'Avril à Juin, à odeur très agréable et spécifique. Très commun dans les régions montagneuses, c'est une espèce endémique d'Algérie (Quezel et Santa, 1963).



Figure I.8. *Thymus fontanesii* (Image originale)

Les chapitres qui vont suivre sont expérimentaux, Le chapitre II sera consacrée à l'extraction et la valorisation de l'HE de *Thymus fontanesii*, cette HE fera l'objet du produit de base pour l'étude de l'effet de la combinaison des principes actifs.

**Chapitre II. Étude du
procédé de l'extraction
de l'huile essentielle de
*Thymus fontanesii***

II.1. Objectif du chapitre

Ce chapitre sera consacré à l'étude d'un procédé d'extraction de l'HE d'une espèce de thym appelée *Thymus fontanesii*. Le procédé proposé est l'hydrodistillation type Clevenger. Nous définirons et expérimenterons deux paramètres influençant le rendement de l'extraction (masse de la matière végétale et débit de la vapeur d'eau).

La détermination de la cinétique de l'extraction ainsi que l'application de deux modèles issus de la littérature sur cette cinétique seront exposées.

La caractérisation de l'HE obtenue dans les conditions optimales sera également illustrée dans ce chapitre.

II.2. Introduction

Les essences végétales, produits fragiles, aromatiques et volatils, sont synthétisées par les végétaux. C'est par l'extraction de ces essences que l'on obtient l'HE.

Il existe plusieurs procédés permettant leur extraction. Le choix d'un procédé dépendra de la partie botanique utilisée et de sa fragilité qui affectera la qualité et la quantité de l'HE qui détermineront son utilisation ultérieure (pharmacie, cosmétiques... etc).

Parmi ces procédés, l'hydrodistillation par le système « Clevenger » (Clevenger, 1928), qui représente la technique la plus utilisée universellement. Elle est préconisée par la Pharmacopée Européenne (Pharmacopée Européenne, 1997).

Les HEs sont des mélanges complexes constitués de dizaines, voir de centaines de molécules présentes à des concentrations parfois extrêmement faibles. La valorisation de ces mélanges passe obligatoirement par une étape de caractérisation de la composition chimique, ce qui nécessite des techniques analytiques fiables et efficaces (Joulain, 1994).

La localisation des organes de sécrétion des essences dans la plante donne l'avantage dans la sélection du procédé proposé et dans l'interprétation de la cinétique de l'extraction observée.

II.3. Travaux antérieurs

Les travaux existant dans la littérature sont relatifs à la composition chimique de l'HE extraite du *Thymus fontanesii*. Cependant les études relatives à la cinétique de l'extraction ainsi qu'à l'application de modèles cinétiques sont rares.

D'après l'étude menée par Nickavar et al. (2005), environ 110 espèces du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen. Selon Dob et al. (2006), il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée. C'est une plante

très répandue dans le nord africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye). Sa répartition géographique en Algérie est représentée dans le tableau II.1.

Tableau II.1. Localisation des principales espèces de thym en Algérie (Saidj, 2006).

Espèces	Découverte par	Localisation géographique
<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Algérie/ Tunisie
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et Link	Rare dans la région de Tlemcen
<i>Thymus Commutatus</i>	Battandier	Endémique d'Oran
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Tell Constantinois La grande et la petite Kabylie
<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Rare dans le sous-secteur de l'Atlas Saharien et Constantinois.
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun saur sur le littoral
<i>Thymus algériensis</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord Algérois.

➤ Rendement en HE

L'essence du *Thymus fontanesii* est localisée dans ces feuilles ; Ghannadi et al. (2004), rapportent que le rendement en HE extraite à partir de ces feuilles pour la région de Sétif est d'environ 1.9%. Ce rendement est légèrement inférieur à celui obtenu pour la région de Mostaganem (2%) (Haddouchi et al., 2009).

Selon une étude menée par Bekhechi et al. (2007), l'HE de *Thymus fontanesii* extraite de quatre régions différentes de Tlemcen présente un rendement d'environ 5%.

Cependant, le rendement en huile obtenu par Dob et al. (2006), de celui de la région de Djelfa est nettement inférieur, car il est de 0.9%.

➤ Caractéristiques physico-chimiques

Les études effectuées sur les caractéristiques physico-chimiques des HEs de *Thymus fontanesii* consistent en la détermination de sa densité, son indice de réfraction et de son pouvoir rotatoire.

Le Tableau II.2. Illustre quelques caractéristiques physico-chimiques des HEs extraites à partir des feuilles de *Thymus fontanesii*.

Tableau II.2. Caractéristiques physico-chimiques de l'HE de *Thymus fontanesii*

	Mebarki, 2010	Haddouchi et al. (2009)
Densité relative à 20°C	0,928	0,9219
Indice de réfraction à 20°C	1,5015	1,4999
Pouvoir rotatoire	0°	0°

Les caractéristiques physico-chimiques des HEs de *Thymus fontanesii* varient légèrement, selon la littérature.

➤ **Composition chimique**

Les composés majoritaires pour toutes les espèces de thym confondues sont: le thymol, le carvacrol, le γ -terpinène, le p-cymène et le linalool.

Le tableau II.3 résume les principaux composés des HEs extraites à partir des feuilles de quelques espèces de Thym.

Tableau II.3. Composition chimique des HEs de quelques espèces de thym

Auteur	Espèces	Pays	Composés majoritaires
Cosentino et al., 1999	<i>T. herba-barone</i>	Italy	p-cymène (27,6%), thymol (50,3%), carvacrol (2,9%), γ -terpnène (6,1%), linalool (5,8%).
Rasooli et Mirmostafa., 2002	<i>T. serpyllum</i> (avant floraison)	Iran	p-cymène (21,12%), thymol (18,73%), carvacrol (1,34%), γ -terpnène (21,90%), linalool (1,08%).
Rasooli et Mirmostafa., 2002	<i>T. serpyllum</i> (à la floraison)	Iran	p-cymène (2,85%), thymol (18,68%), carvacrol (0,41%), γ -terpnène (22,69%).
Ozcan and Chalchat., 2004	<i>T. vulgaris</i>	Turquie	p-cymène (9,9%), thymol (46,2%), linalool (4%), γ -terpnène (14,1%).
Tepe et al., 2005	<i>T. rosulans</i>	Turquie	p-cymène (4,1%), thymol (20,5%), Carvacrol (58,1%), γ -terpnène (4,4%).
Bounatirou et al., 2007	<i>T. capitatus</i>	Tunisie	p-cymène (5,1%), carvacrol (62,83%), γ -terpnène (2,4%)
Rota et al., 2008	<i>T. zygis</i>	Espagne	p-cymène (0,5%), thymol (2,1%), carvacrol (0,1%), Linalool (82,3%).
Rota et al., 2008	<i>T. vulgaris</i>	Espagne	p-cymène (18,7%), thymol (57,7%), carvacrol (2,8%), linalool (2,1%).

Les résultats cités par ces chercheurs présentent une différence considérable du point de vue de la composition chimique. A des fins de comparaison, Djouahri et al. (2015), a rapporté un résumé des travaux réalisés sur la composition chimique des HEs extraites à partir de *Tetradlea articulata* d'origines géographiques diverses. Ces auteurs ont mis en évidence les différences significatives dans les rendements et la composition chimique des HEs extraites des feuilles de *T. articulata* (Vahl), collectées à partir de quatre sites en Algérie. Bien que les principaux constituants de toutes les huiles fussent identiques, leurs pourcentages étaient différents.

Les travaux de Dob et al. (2006) et Ghannadi et al. (2004), ont révélé que l'HE extraite à partir de la partie aérienne de *Thymus fontanesii* récoltée dans la province de Djelfa et de Sétif (Algérie), a pour composé majoritaire le thymol. Cependant, les résultats obtenus par Bekhechi et al. (2009), pour la même plante de la Province de Tlemcen ont montré une prédominance de son isomère le carvacrol. Les différentes compositions révélées de l'HE des différentes régions algériennes sont regroupées dans le Tableau II.4.

Tableau II.4. Composition chimique des HEs de *Thymus fontanesii* récolté en Algérie

Auteur	Région	Composés majoritaires
Mebarki, 2010	Lakhdaria	thymol (44,33%), carvacrol (34,98%), γ -terpnène (1,22%)
Ghannadi et al. (2004)	Setif	p-cymene (13,0%), thymol (67,8%), γ -terpnène (15,9%)
Dob et al. (2006)	Djelfa	p-cymene (15,9%), thymol (29,3%), carvacrol (1,8%), γ -terpnène (21,7%).
Bekhechi et al. (2009)	Tlemcen (Sidi-snoussi, Remchi, Sebdou et Sebâa-chiouki)	p-cymene (6,1-9,1%), thymol (0,6- 0,7%), carvacrol (66,7- 69,5%), γ -terpnène (6,0- 9,6%), linalool (3,0- 4,0%).

➤ Techniques et procédés d'extraction des huiles essentielles

Le procédé de l'hydrodistillation est le plus simple à mettre en œuvre et le moins couteux. De ce fait, il a été appliqué dans de nombreux travaux. (Bekhechi et al., 2009; Dob et al., 2006; Ghannadi et al., 2004).

Les résultats de Hadhili et al. (2006) ont montré que la méthode la plus performante en rendement d'extraction a été l'hydrodistillation pour l'extraction de l'HE de *Thymus capitatus*.

Avec l'avènement des méthodes alternatives de l'extraction, le thym a fait l'objet de plusieurs études expérimentales.

Maldao et al. (2000), ont trouvé que le rendement en HE extraite par le dioxyde de carbone à l'état supercritique est plus important comparativement à celui obtenu par entraînement à la vapeur d'eau.

Moyler. (1998), a démontré que le procédé de l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique est très coûteux.

II.4. Matériels et méthodes

1) Matériel végétal

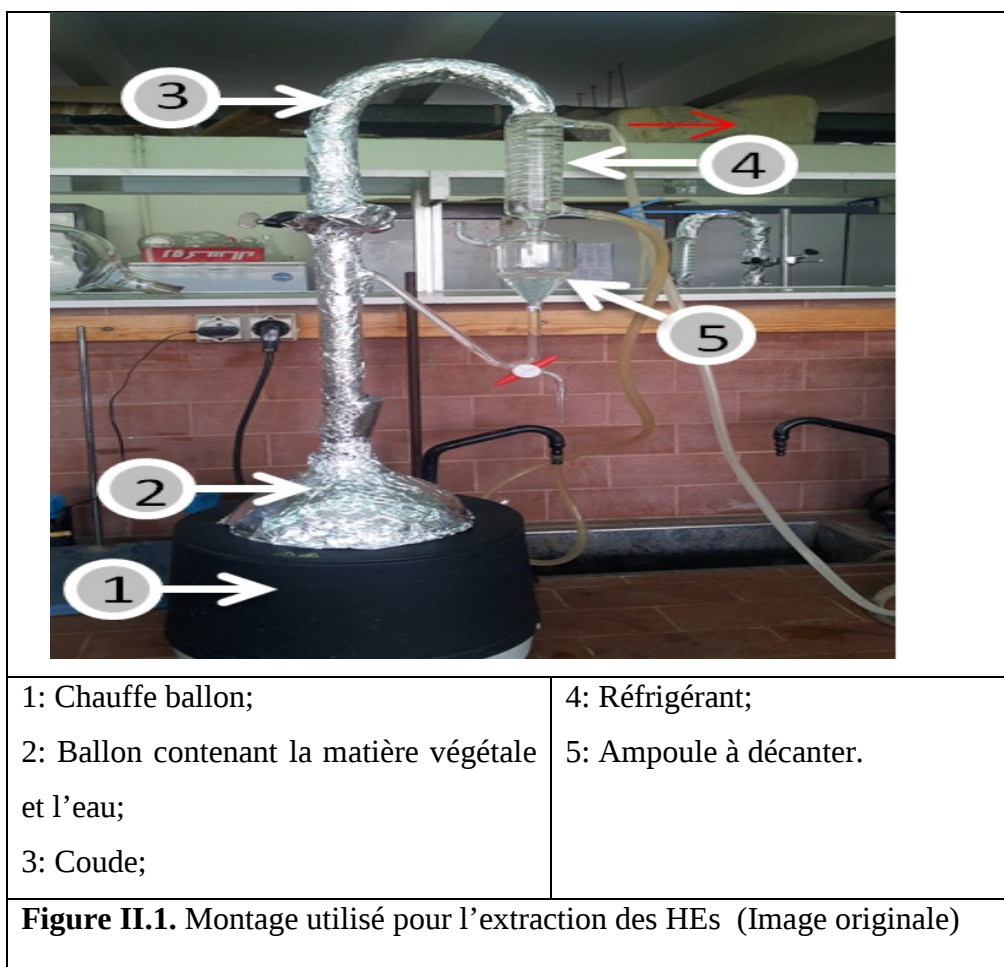
Le *Thymus fontanessi* utilisé provient d'une région montagneuse de Médéa située à quatre-vingt kilomètres au sud-ouest d'Alger. La récolte de la partie aérienne a été réalisée au mois d'Avril 2013. L'identification botanique de la plante a été réalisée au niveau de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (l'ENSA). La plante a été séchée au laboratoire à température ambiante, à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

2) Extraction des huiles essentielles de *Thymus fontanesii*

L'extraction des HEs a été réalisée par hydrodistillation au moyen d'un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928). Le schéma du montage utilisé est présenté dans la Figure II.1.

La charge de la matière végétale ainsi que le débit du condensat sont les paramètres qui ont été optimisés au fil des expériences.

Le condensât est recueilli après chaque extraction dans une ampoule à décanter qui sépare la phase aqueuse de la phase organique constituant l'HE. Cette huile est conservée en réfrigération dans un flacon hermétique.



2.1.Détermination du taux d'humidité de la matière végétale

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 $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. 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). Le taux d'humidité Y de la matière végétale est donné par l'équation (II.1)

$$Y = \frac{M_i - M_s}{M_i} \quad (\text{II.1})$$

Avec;

Y : Teneur en eau ou taux d'humidité;

M_i : Masse des feuilles avant introduction à l'étuve ;

M_s : Masse des feuilles à la stabilisation du poids.

2.2. Calcul du rendement de l'extraction

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'HE obtenue et la masse du matériel végétal sec, il est calculé à partir de l'équation II.2;

$$R(\%) = \frac{M_h}{M_c \cdot (1 - Y)} \times 100 \quad (\text{II.2})$$

Avec;

R: Rendement en huile essentielle en g /100g de matière sèche;

M_h: Quantité d'HE récupérée exprimée en g;

M_C : Quantité de la matière végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g;

Y: Taux d'humidité de la matière végétale utilisée.

3) Optimisation des paramètres de l'extraction par hydrodistillation

L'optimisation consiste à déterminer les meilleures conditions opératoires ayant pour finalité d'aboutir à un rendement optimum. Pour ce faire, deux méthodes d'optimisation ont été suivies: une optimisation paramétrique et une optimisation par planification des expériences.

Les paramètres répertoriés dans la littérature qui influent sur le rendement de l'extraction de l'HE sont: le temps, la température du distillat, le débit de condensation; le facteur de division de la matière végétale, le rapport de matière végétale/masse d'eau et la perte en eau par la matière végétale (Denny, 1991).

Lors d'une hydrodistillation, la vapeur d'eau est un véhicule permettant le transport des substances aromatiques contenues dans la plante. Ainsi le débit de la vapeur d'eau qui est impliqué dans l'entraînement des molécules organiques représente un facteur important pour le procédé de l'hydrodistillation. Cependant, cette vapeur traversant une couche plus ou moins importante de végétaux, la masse du matériel végétal est, de ce fait également, un paramètre important.

Pour l'optimisation de ce procédé, nous nous sommes limités à ces deux paramètres opératoires, en l'occurrence: la masse de la matière végétale (M) et le débit de la vapeur d'eau représenté par le débit du condensat (Q).

Le choix de ces deux paramètres est dicté par le résultat d'une étude préliminaire composée de plusieurs expériences. Elles nous ont permis de déterminer que les deux facteurs

qui influent particulièrement la cinétique de l'extraction de l'HE sont la masse de la matière végétale et le débit de la vapeur d'eau.

Le principe de cette méthode consiste à varier un des deux paramètres étudiés en gardant le second constant et à estimer son influence sur le rendement en HE. Dans cette étude les deux paramètres opératoires sont supposés indépendants, c'est-à-dire que leurs interactions n'influent pas sur l'évolution du système étudié.

Cette méthode d'optimisation permet d'atteindre l'effet individuel de chacun des paramètres sur le rendement sans tenir compte des interactions entre eux. Or, en réalité, les paramètres ne sont pas indépendants. Afin d'évaluer leur effets conjugués, nous avons eu recours à une optimisation par la planification des expériences.

Le plan d'expériences choisi est le plan factoriel complet à deux niveaux avec deux facteurs. Le traitement mathématique se présente comme suit:

En premier lieu, on va fixer et réunir dans un tableau les niveaux inférieurs et supérieurs des paramètres à optimiser. Le rendement de l'hydrodistillation (Y%) dépend des deux facteurs; ce qui se traduit mathématiquement par: $Y\% = f(X_1, X_2)$ avec:

Y (la Réponse) qui représente le rendement en HE (%).

Facteur 1(X_1): Masse de la charge utilisée dans le ballon (g).

Facteur 2 (X_2): Débit du distillat (ml /min).

On dispose d'un plan factoriel complet (PFC) à deux niveaux avec deux facteurs ($K=2$), la formule générale du nombre (N) d'expériences pour ce type de plan est: $N= 2^K$, avec k, le nombre de variables du plan factoriel. Donc : $N=2^K=2^2=4$ expériences.

Les niveaux des expériences sont représentés dans le tableau II.5.

Tableau II.5. Niveaux des expériences du plan factoriel

N ⁰ essai	X ₀	X ₁	X ₂	X ₁₂	Y
1	+1	-1	-1	+1	Y ₁
2	+1	+1	-1	-1	Y ₂
3	+1	-1	+1	-1	Y ₃
4	+1	+1	+1	+1	Y ₄
Division	4	4	4	4	
Effets	a ₀	a ₁	a ₂	a ₁₂	

Le modèle mathématique avec les variables codées se traduit par l'équation II.3:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{12}X_1X_2 \quad (\text{II.3})$$

Les coefficients ont pour signification : moyenne, a_0 ; effets principaux, a_i ; interactions a_{ij} . L'estimation des coefficients est faite selon les calculs ci-après et donnée par la matrice des effets :

$$a_0 = (Y_1 + Y_2 + Y_3 + Y_4)/4 \quad (\text{II.3.1})$$

$$a_1 = (-Y_1 + Y_2 - Y_3 + Y_4)/4 \quad (\text{II.3.2})$$

$$a_2 = (-Y_1 - Y_2 + Y_3 + Y_4)/4 \quad (\text{II.3.3})$$

$$a_{12} = (Y_1 - Y_2 - Y_3 + Y_4)/4 \quad (\text{II.3.4})$$

Toutes ces expériences sont réalisées pour un même lot de matière végétale qui a atteint un taux d'humidité d'équilibre.

4) Etude de la cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Pour assurer une hydrodistillation complète, il faut récupérer la majorité des constituants aromatiques tout en assurant une durée d'extraction relativement faible.

Pour ce faire, on cherche à déterminer la durée optimale de ce procédé d'extraction qui permet de satisfaire la condition de qualité (c'est-à-dire obtenir tous les constituants).

La cinétique de l'extraction de l'HE de *Thymus fontanesii* a été réalisée dans les conditions optimales: débit du distillat de 2,6 ml/mn et une masse du végétal de 40g/400ml d'eau. Des fractions de l'huile ont été recueillies à des intervalles de temps jusqu'au temps $t = 90$ minutes (temps d'équilibre de l'extraction). Deux essais ont été réalisés pour ces expériences.

5) Application de deux modèles cinétiques sur les données de la cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Afin de valoriser les données expérimentales obtenues et pour une meilleure compréhension des phénomènes de l'extraction, nous nous sommes intéressées à la modélisation des extractions par l'application de deux modèles cinétiques. Ces modèles sont illustrés dans le chapitre I paragraphe 2.7.

6) Visualisation des poches sécrétrices de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Afin de confirmer les hypothèses des modèles appliqués, nous avons observé la surface des feuilles de Thym par microscopie électronique à balayage MEB.

Ces observations sont réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage de type JOEL JSM-6360. Les échantillons ont été vaporisés d'une fine couche de carbone avant d'être observés.

Ainsi, le calcul de la circularité des poches sécrétrices a été effectué par le biais de l'analyse d'images.

7) Caractérisation de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Les organismes de normalisation ont édictés un certain nombre de règles qui concernent les propriétés organoleptiques, les caractéristiques physico-chimiques et le profil chromatographique des extraits aromatiques.

➤ Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) de l'HE du Thym extraite ont été notées.

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

Toutes les méthodes d'analyse physiques et chimiques des HEs extraites sont réalisées suivant la norme AFNOR (ANNEXE 1).

➤ Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

L'élaboration du profil chromatographique de l'HE du Thym a été réalisée selon les normes AFNOR (NF ISO 11024-1: 1999).

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un Chromatographe en Phase Gazeuse (CPG) à régulation électronique de pression, de type Hewlett Packard (série HP 6890, Palo Alto, Californie, USA), équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0.25 mm) avec une épaisseur de film de 0.25 μm , un détecteur FID réglé à 280 °C et un injecteur *split-splitless*. Le mode d'injection est *split*.

Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1.7 ml.min⁻¹. La température de la colonne est programmée de 45 à 240°C à raison d'une montée de 2°C.min⁻¹.

L'appareil est piloté par un système informatique de type «HP Chem Station», gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs Indices de Kovats (IK) et sur la Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM).

Cette dernière est réalisée sur un CPG de type Hewlett-Packard (série HP 6890) couplé avec un Spectromètre de Masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70eV.

Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixe à 1.2 ml.min⁻¹. Le mode d'injection est *split* (rapport de fuite : 1/20). L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse (Wiley7, NIST 2002).

L'identification des constituants est basée sur la comparaison de leurs spectres de masse respectifs avec les spectres de la bibliothèque et de la bibliographie (Adams, 2001) et sur la base de calcul des Indices de Rétention (IR).

L'IR d'un composé A est indépendant du débit, de la longueur de la colonne et de la quantité injectée. L'IR d'un composé « A » dépend de la phase stationnaire et de la température. Les IR sont calculés comme indiqué par l'équation II.4.

$$IR = 100n + \left[\frac{TR_c - TR_n}{TR_{(n+1)} - TR_n} \right] * 100 \quad (II.4)$$

Avec;

n: Nombre d'atomes de carbone de l'alcane élué avant le composé ;

TR_c: Temps de Rétention du composé ;

TR_n: Temps de Rétention de l'alcane à n atomes de carbone élué avant le composé ;

TR_(n+1): Temps de Rétention de l'alcane à n+1 atomes de carbone élué après le composé.

II.5. Résultats et discussion

1) Détermination du rendement de l'extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Le taux d'humidité Y de la matière végétale est de 8,4%. Les rendements de l'extraction ont été déterminés par l'équation (II.2) et sont égales à 2,4±0,46.

Le rendement en HE obtenu à partir des feuilles de *Thymus fontanesii* est proche à celui obtenus par Heddouchi. (2009) pour la même plante issue de la région de Mostaganem (2%) ainsi que celui trouvé par Ghannadi. (2004) récolté de la région de Setif et il est considéré comme important par rapport à celui révélé par Dob et al. (2006) (0,9%).

Cependant, il reste inférieur à celui trouvé par Bekhechi et al. (2007) obtenue à partir de quatre régions différentes de Tlemcen, qui est d'environ 5%.

Par conséquent, le rendement pour notre cas, est appréciable et peut être rentable pour une application à l'échelle industrielle.

2) Optimisation des paramètres expérimentaux

2.1. Optimisation de la masse de la matière végétale

Différentes expériences ont été réalisées pour un débit moyen du distillat constant de 2,61ml/min et un temps d'extraction $t=90$ minutes, pour déterminer l'influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en HE.

Les valeurs donnant la variation du rendement en fonction de la masse de la matière végétale, sont illustrées par la figure II.2.

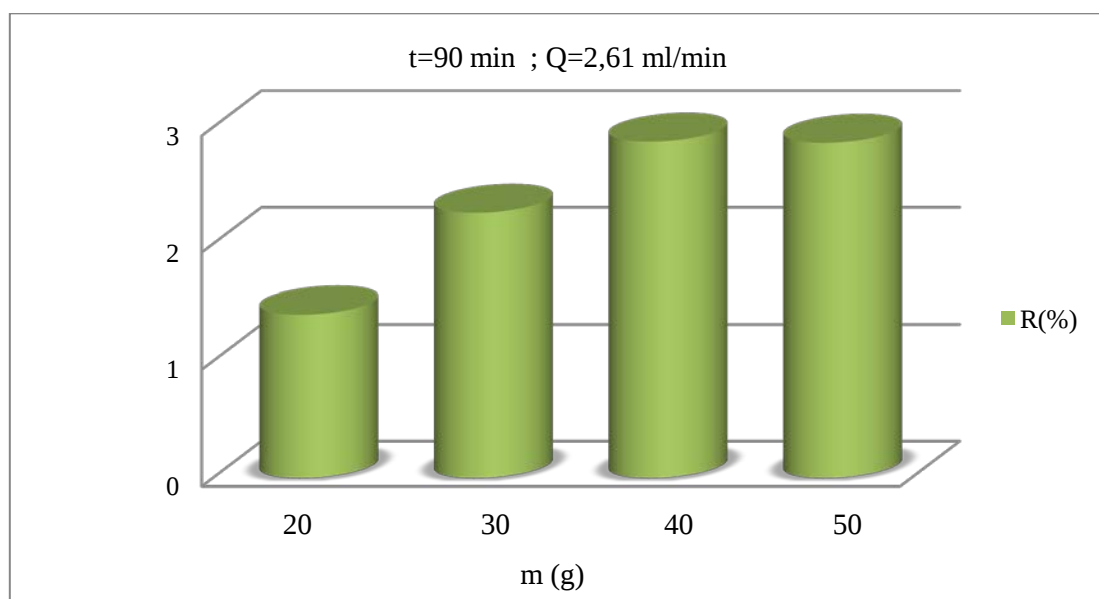


Figure II.2. Evolution du rendement en HE en fonction de la masse de la matière végétale.

L'examen de la figure II.2, nous permet de remarquer que le meilleur rendement est obtenu pour une masse de 40g, par ailleurs, pour les masses supérieures à 40g la masse n'a pas d'influence sur le rendement.

Par contre pour les masses inférieures à 40 g, nous observons une diminution du rendement due à un mauvais contact entre la vapeur et la plante qui surnage à la surface de l'eau, d'où une mauvaise extraction.

2.2. Optimisation du débit du condensat de la vapeur d'eau

Pour déterminer l'influence du débit de la vapeur d'eau sur le rendement en HE, les essais résumés dans la figure II.3 ont été effectués. La masse de la matière végétale a été fixée à 40g et le temps de l'extraction à 90 minutes.

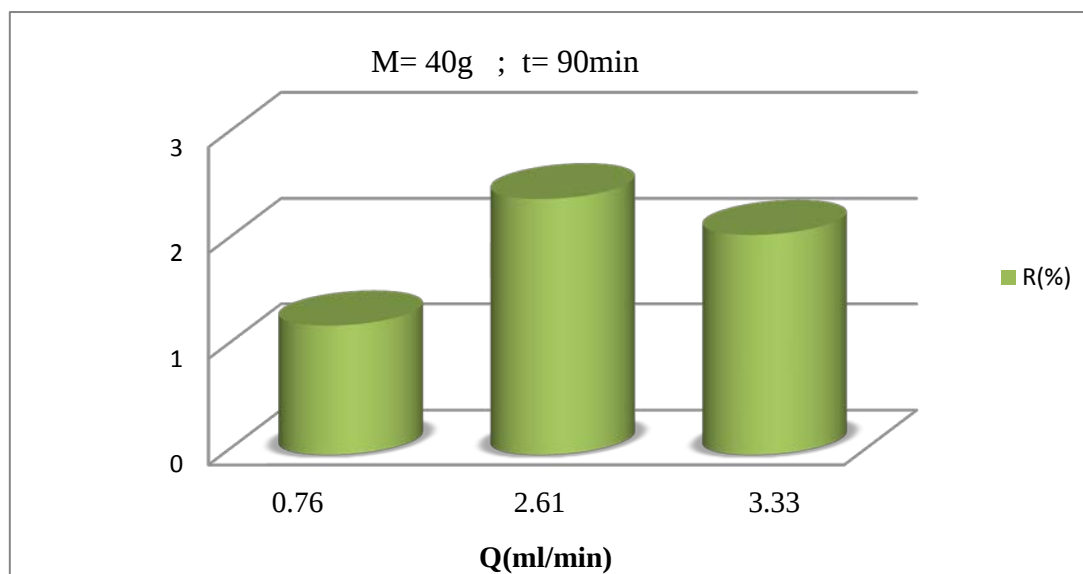


Figure II.3. Evolution du rendement en HE en fonction de débit du distillat

D'après la figure II.3, nous distinguons que le maximum en HE est obtenu pour un débit moyen de 2,61 ml/min, cela pourrait être expliqué par le fait que pour un faible débit (0,76 ml/min), la vapeur d'eau n'est pas assez importante pour entraîner l'huile extraite. Aussi pour un plus fort débit, (3,33 ml/min) le temps de séjour de la vapeur d'eau en contact avec la matière végétale, n'est pas suffisant pour l'extraction.

2.3. Optimisation par le plan d'expériences

Les conditions opératoires des quatre essais programmés et réalisés, ainsi que les rendements R_{HE} en huile obtenus, sont regroupées dans le tableau II.6.

Tableau II.6. Conditions opératoires des essais programmés et rendements R_{HE} en huile obtenus.

N° d'essai	X_0	X_1	X_2	X_{12}	Y
1	+1	-1	-1	+1	2,3059
2	+1	+1	-1	-1	2,4567
3	+1	-1	+1	-1	2,3423
4	+1	+1	+1	+1	2,4921
Division	4	4	4	4	
Effets	$a_0 = 2,39925$	$a_1 = 0,07515$	$a_2 = 0,01795$	$a_{12} = -0,00025$	

Niveau -1	20 (g)	0,7 (ml/mn)
Niveau +1	40 (g)	2,6(ml/mn)

Les points au centre de chaque intervalle ont été effectués avec répétition afin de valider le modèle, il s'agit de la masse de 30 grammes et du débit de 1,65 ml/min ($2,375 \pm 0.03$).

Les résultats du tableau II.6 ont été analysés à l'aide du logiciel JMP. L'équation du modèle mathématique obtenu se traduit par l'équation II.5;

$$Y = 2.39925 + 0.07515 X_1 + 0.01795 X_2 - 0.00025 X_{12} \quad (\text{II.5})$$

Les valeurs des coefficients de cette équation permettent d'évaluer l'influence sur le rendement en HE, des effets individuels de chacun des paramètres étudiés et de leur interaction. Le diagramme de Pareto, présenté par la figure II.4, illustre ces différents effets.

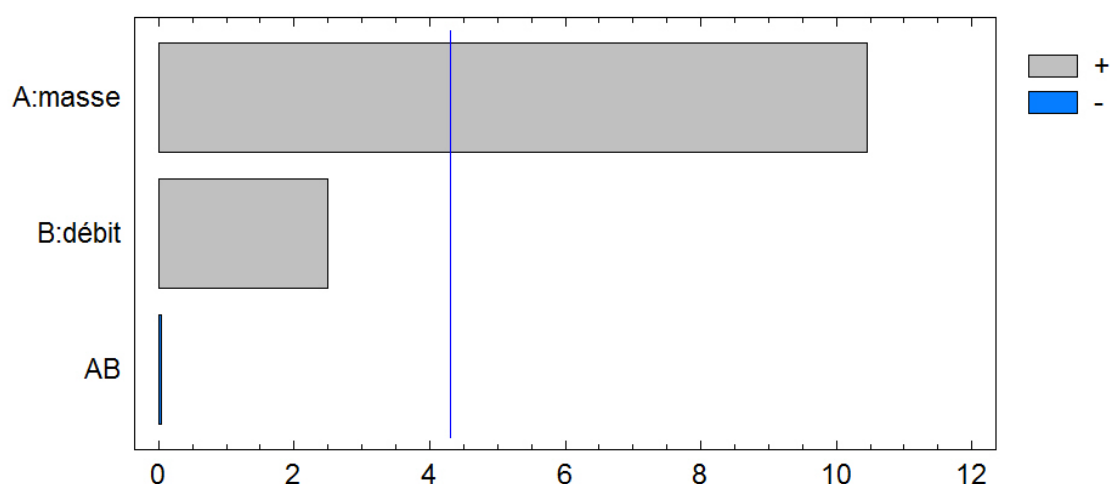


Figure II.4. Diagramme de Pareto

On relève qu'au seuil de confiance spécifié, $\alpha = 4,25\%$, le paramètre masse de la matière végétale a un effet significatif. L'effet simple du débit de distillat a une faible influence par rapport à la masse et l'effet conjugué très faible et négatif.

L'effet de la masse est de 0,7515 grammes pour une variation de 10 grammes en masse de la matière végétale (Figure II.5). On peut donc améliorer le rendement en augmentant la masse de la matière végétale.

L'effet du débit de la vapeur est de 0,01795 ml/min pour une variation de 0,95 ml/min. Il en résulte qu'il faut augmenter le débit de vapeur pour améliorer le rendement.

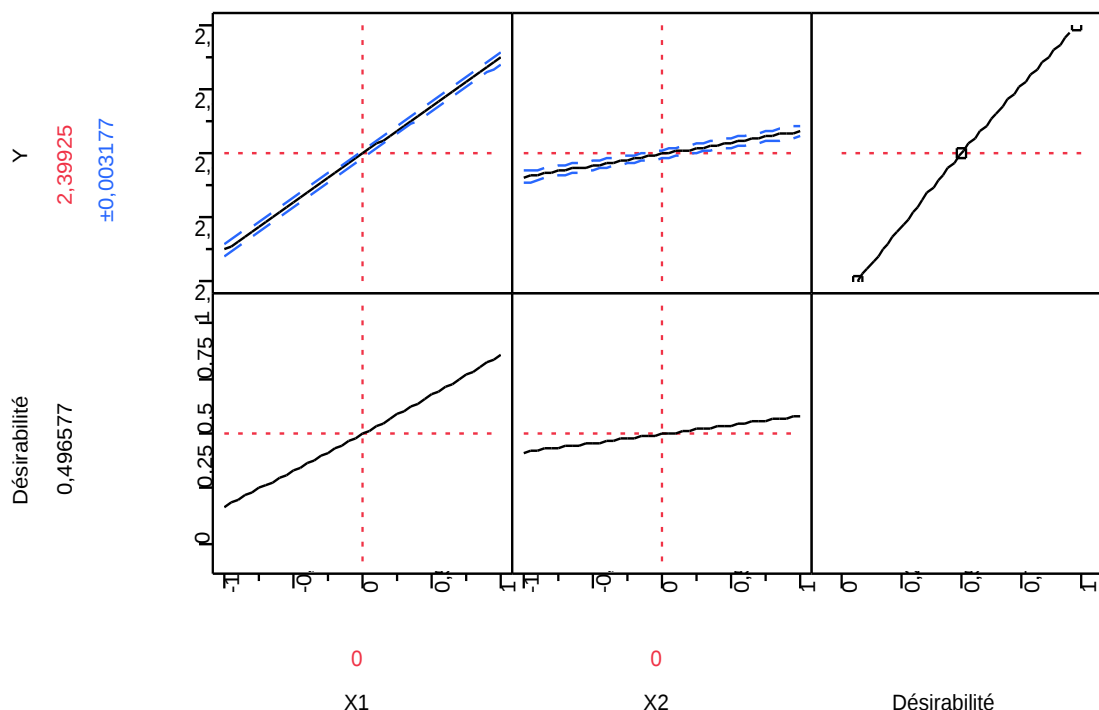


Figure II.5. Diagramme des effets

De même et d'après la figure II.5, on remarque que les droites sont croissantes quand on passe du niveau bas au niveau haut. Cependant la différence est plus prononcée, soit 0,1503, pour le facteur 1 par rapport au facteur 2 qui n'est que de 0,0359.

La valeur de « Student » du premier facteur est plus grande que celle du deuxième facteur. Ceci nous permet de conclure que l'augmentation du rendement en huile essentielle est beaucoup plus impactée par le premier facteur, en l'occurrence la masse.

La qualité de l'approximation et la validité du modèle mathématique établi sont mises en évidence par l'analyse statistique de la variance (ANOVA) présentée dans le tableau II.7.

Tableau II.7. Analyse de la variance (ANOVA).

Paramètre	Somme des carrées	Carrée moyen	Rapport F
A:masse (X1)	0,0225901	0,0225901	109,34
B:débit (X2)	0,00128881	0,00128881	6,24
AB (X1, X2)	2.5E-7	2.5E-7	0,00
Erreur totale	0,000413223	0,000206612	
Total (corr.)	0,0242924		

$$R^2 = 98,30\%$$

Erreur absolue moyenne = 0,00775556

Les résultats de l'évaluation statistique du modèle montrent que ce dernier décrit correctement le comportement du système étudié. La valeur du coefficient de détermination R^2 indique que le modèle explique 98,30% de la variabilité du rendement en HE.

La valeur de la probabilité sur la masse dans le tableau de l'ANOVA est inférieure à 0,05, nous permet de conclure qu'il y a une relation statistiquement significative entre cette variable au niveau de confiance de 95%. Par ailleurs, l'erreur moyenne absolue est très faible soit 0,77%.

La surface de réponse estimée par le logiciel est présentée à la figure II.6.

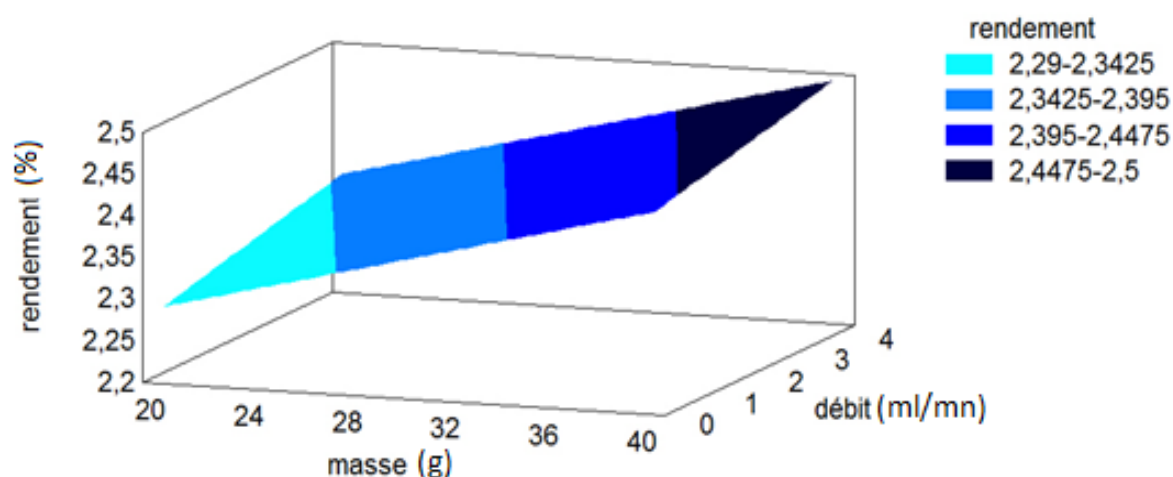


Figure II.6. Surface de réponse estimée

L'examen de la surface de réponse montre que les meilleurs rendements sont obtenus pour des valeurs des variables réduites tendant toutes les deux vers +1. Aussi, les conditions opératoires de l'essai [+1, +1] autrement dit [M= 40g, Q= 2,6ml/mn], soit, en coordonnées réelles, sont indiquées par le logiciel et retenues comme optimales dans le domaine expérimental.

3) Etude de la cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Le temps de l'extraction est théoriquement le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l'HE contenue dans le matériel végétal. Or, en pratique, on ne peut pas récupérer toute l'huile. Ce temps correspond alors au moment pour lequel nous n'observons plus

d'augmentation de la quantité d'huile dans le distillat. Il détermine la fin du processus de l'extraction.

Dans le but d'optimiser la durée de l'extraction, nous avons étudié la cinétique de l'évolution du rendement en HE de *T. fontanesii*. Cette cinétique a été effectuée pendant une durée de deux heures dans les conditions optimales déterminées précédemment (M= 40g, Q= 2,6 ml/mn).

Les fractions de l'HE ont été récupérées à des intervalles de temps plus ou moins réguliers. Chaque essai a été réalisé doublement.

La figure II.7 illustre l'évolution du rendement en HE en fonction du temps. L'équilibre est atteint au bout de 90 minutes (1 heure et demie).

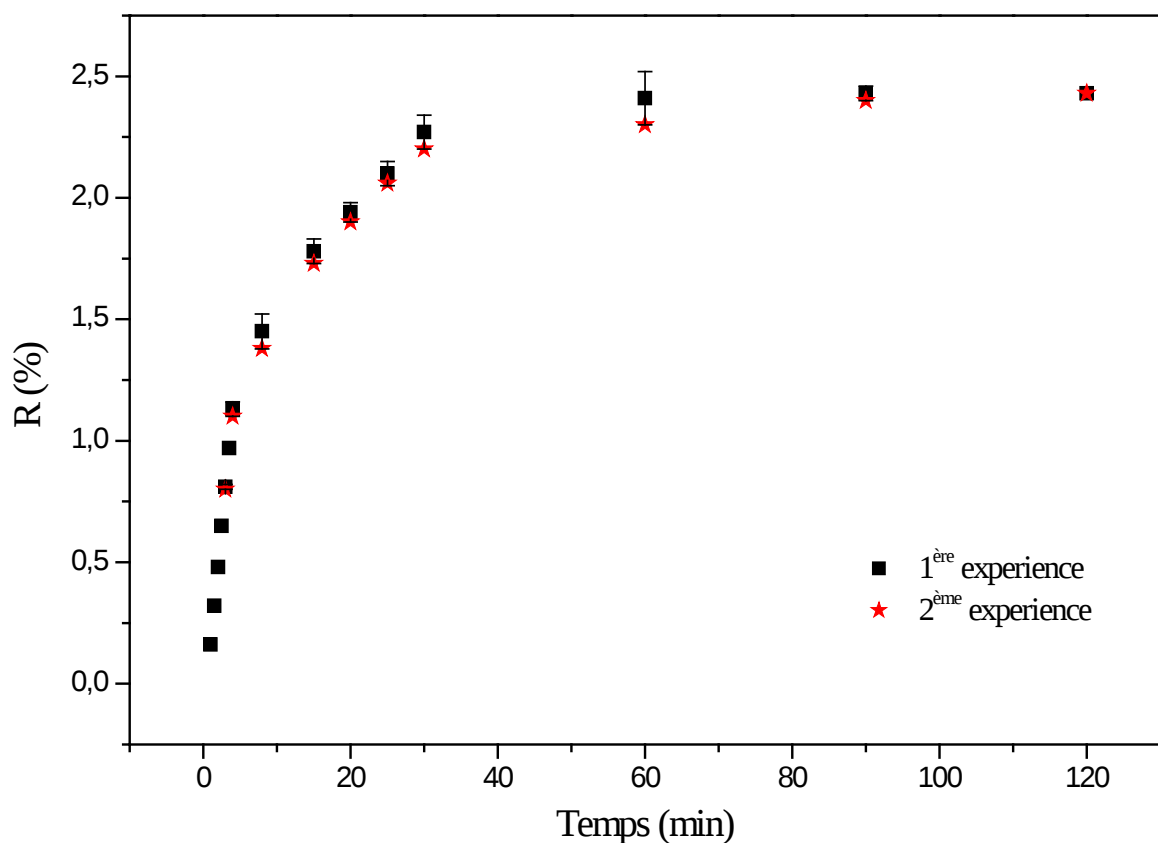


Figure II.7. Evolution du rendement en HE en fonction de temps.

D'après la figure II.7, on remarque que l'allure générale de la cinétique de l'extraction est croissante et qu'elle tend vers un palier au bout d'une heure et demie.

On constate une grande progression du rendement durant les premières minutes qui peut s'expliquer par un entraînement massif de l'HE située à proximité de la surface du végétal et cela dure jusqu'à 30 minutes.

Au-delà, l'évolution du rendement devient plus lente et se termine par un palier qui marque la fin de l'extraction.

Ce résultat permet de limiter le temps de l'extraction à 90 minutes (1h30) traduisant ainsi un maximum de rendement (moment pour lequel nous n'observons plus d'augmentation de la quantité d'HE). A ce stade, situé au début du palier, l'HE est presque totalement extraite.

La durée de l'extraction est fortement liée à la localisation des structures d'élaboration ou de stockage des HEs pouvant être superficielles ou internes. De ce fait, elles ont une influence sur le déroulement de l'hydrodistillation, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mis en jeu, et par conséquent sur la durée.

Dans le cas où ces structures sont superficielles, la membrane externe qui constitue une barrière à la libération de l'huile, est vite rompue et les composés volatils sont aussitôt entraînés par la vapeur d'eau. Lorsque les HEs sont sous-cutanées, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur.

De même, l'évolution temporelle de la vitesse instantanée de l'extraction de l'HE dR_{HE}/dt est déterminée à partir de la courbe de la figure II.7. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure II.8.

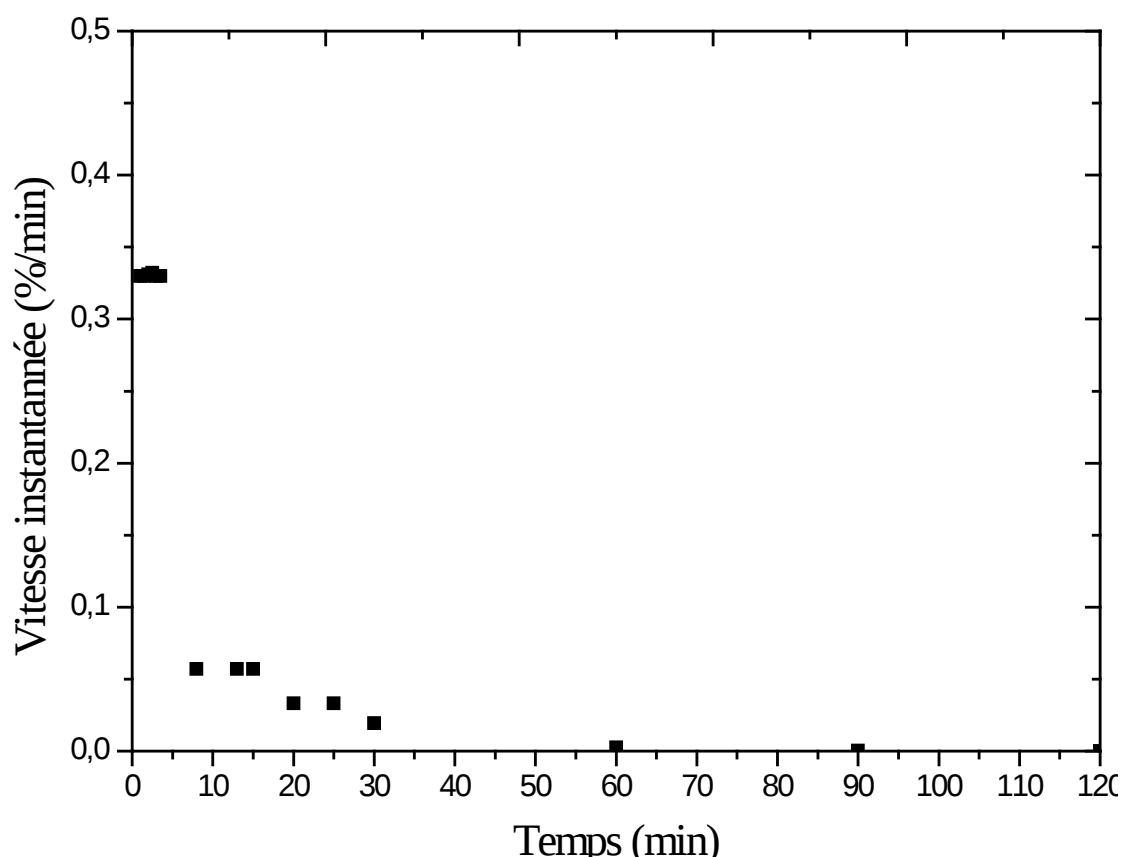


Figure II.8. Evolution de la vitesse de l'extraction de l'HE de *Thymus fontanesii* en fonction du temps.

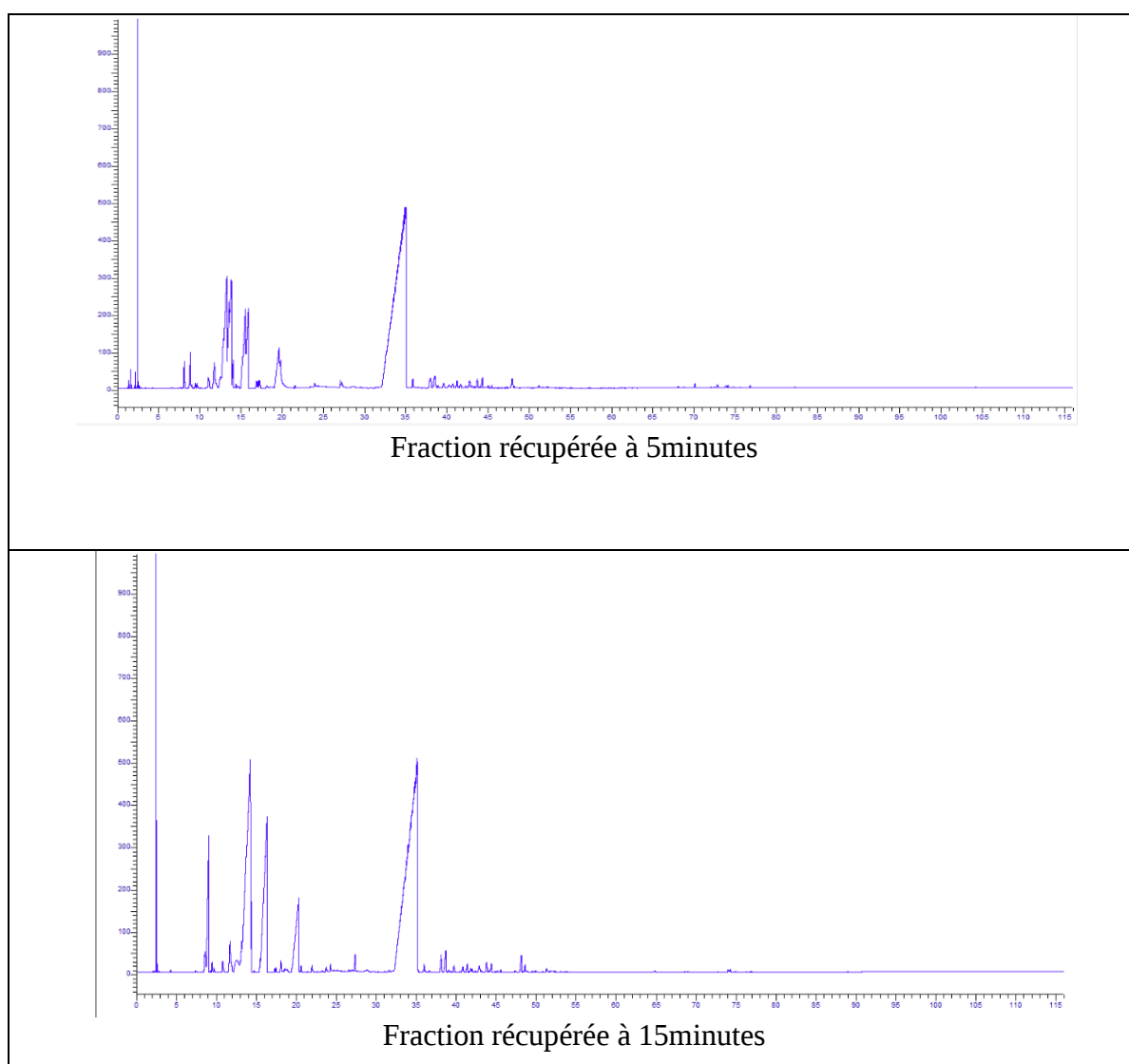
La figure II.8 met en évidence que les plus grandes vitesses de l'extraction (plus ou moins constantes) sont observées durant les quatre premières minutes. Puis on remarque une décroissance rapide jusqu'à la huitième minute. Par la suite, la vitesse redevient constante et ceci jusqu'à la quinzième minute. Au delà de la quinzième minute, la vitesse de l'extraction marque une diminution progressive puis tend à s'annuler.

Pour monter l'importance de la durée du processus de l'extraction, nous prenons comme exemple l'extraction de l'HE de la lavande. Dans l'industrie cosmétique, la lavande est distillée en 15 minutes. Cependant si on veut profiter de l'action thérapeutique de l'HE de la lavande, celle-ci doit être distillée en 45 minutes! Les HEs utilisées dans l'industrie cosmétique ne peuvent pas être utilisées dans un but thérapeutique car elles ne contiennent pas les précieuses molécules à action spécifique. Par conséquent, les composés actifs choisis dépendent de la durée de l'extraction.

D'après la cinétique de l'extraction illustrée, le plus fort taux de l'HE de Thym est obtenu lors des trente (30) premières minutes de traitement, et il ne serait, économiquement, pas avantageux de prolonger l'extraction au-delà.

Par contre, en suivant par chromatographie CPG/FID l'évolution, en fonction du temps d'extraction du pic majoritaire représenté par le composé Carvacrol, auquel plusieurs effets thérapeutiques sont attribués, nous avons observé que sa concentration continue de croître en fonction du temps et ceci jusqu'à 90 minutes.

Les chromatogrammes de l'HE obtenus à différents moments de l'extraction sont regroupés dans la figure II.9.



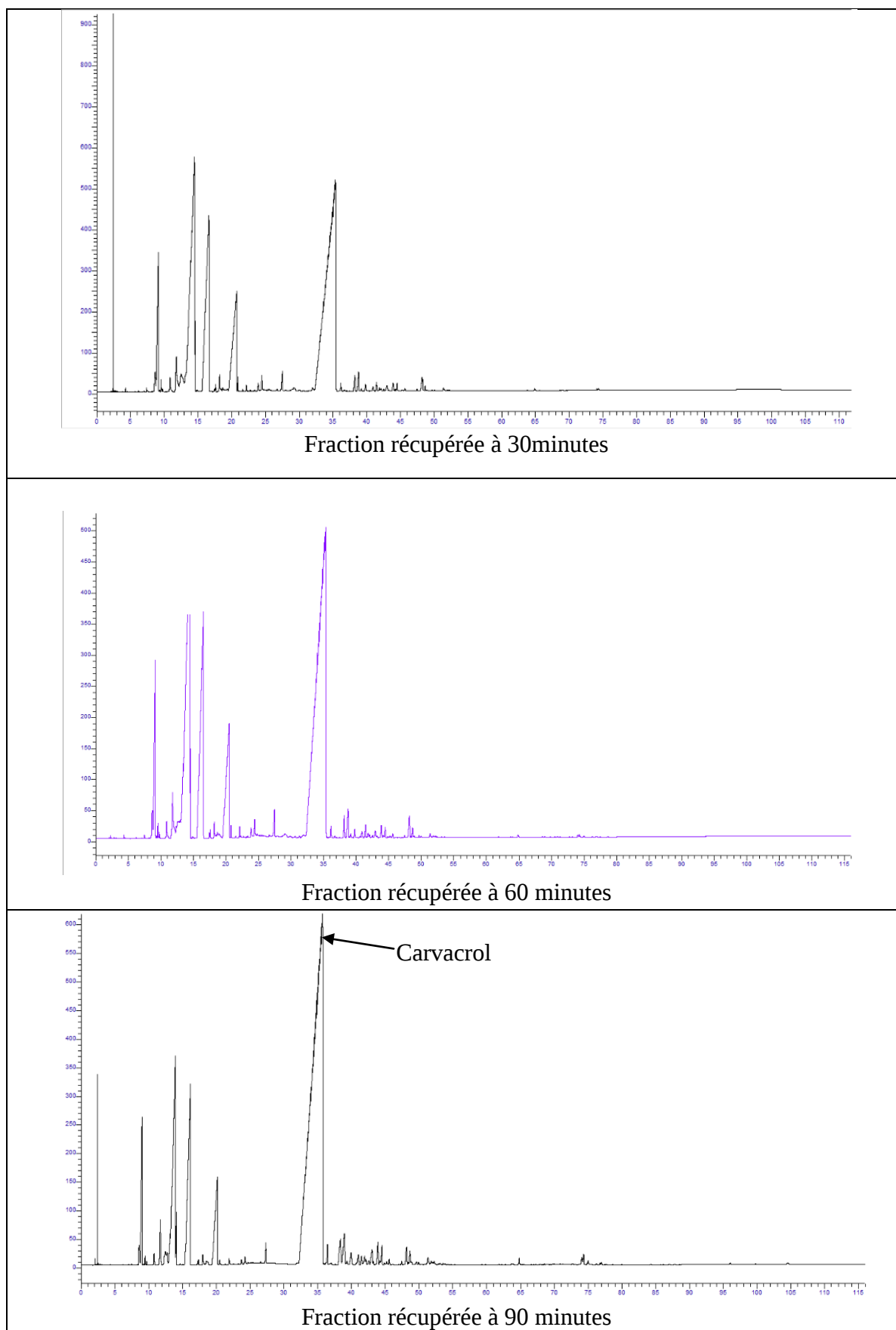


Figure II.9. Chromatogrammes de l'HE récupérée pour chaque fraction

La figure II.10, traduit l'évolution du composé majoritaire (Carvacrol) de l'HE de *T. fontanesii* en fonction du temps de l'extraction.

On constate d'après la figure que la cinétique de l'évolution du Carvacrol ne présente pas la même allure que celle du rendement de l'extraction de l'HE le contenant.

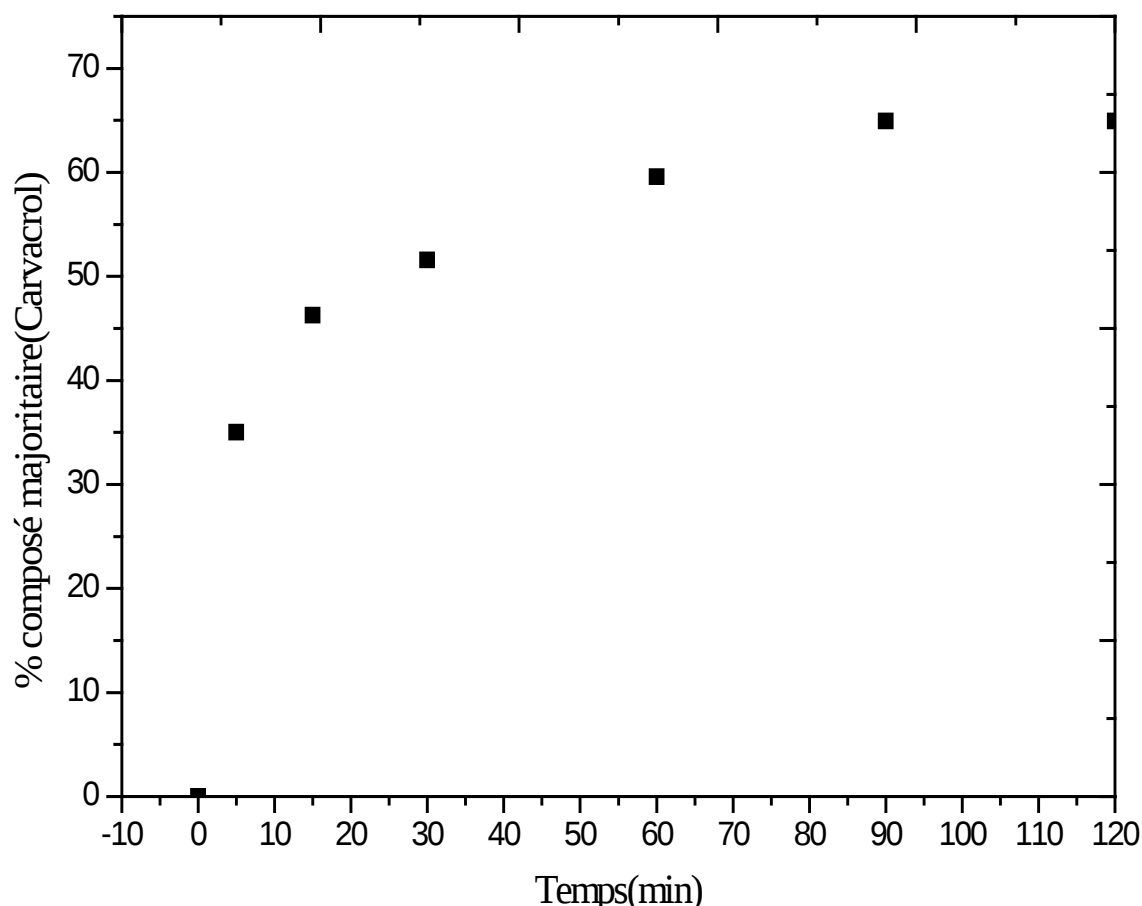


Figure II.10. Evolution du composé majoritaire (Carvacrol) en fonction du temps

On peut expliquer ce résultat par l'existence d'interactions entre les différents composés qui rendent cette cinétique plus complexe relativement à celle de l'HE totale.

La figure II.11 traduit l'évolution temporelle de la vitesse instantanée d'élution du composé majoritaire «Carvacrol» en fonction du temps de l'extraction.

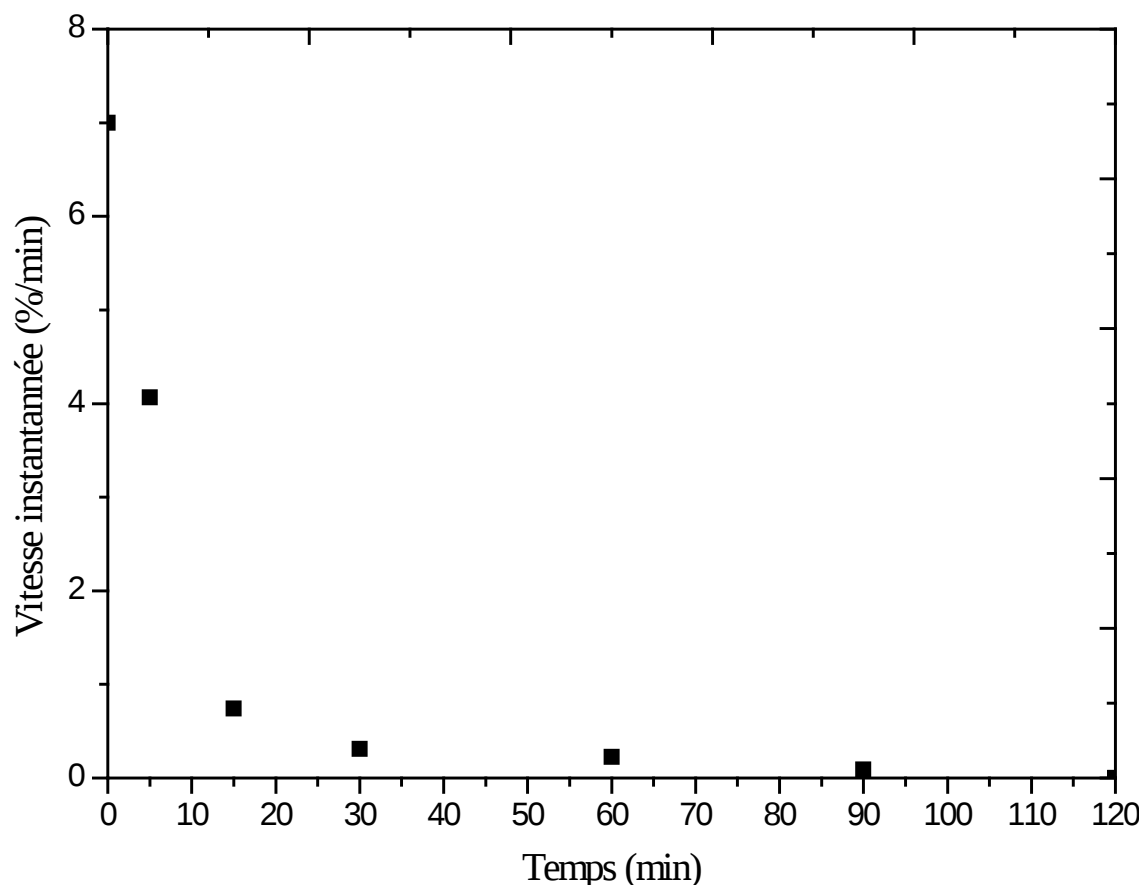


Figure II.11. Evolution de la vitesse de l'évolution du composé majoritaire «Carvacrol» en fonction du temps.

D'après la figure II.11, on constate l'existence de trois zones. La première (0-15min) avec une droite décroissante importante. La deuxième zone (15-30min) présente une décroissance moins rapide. La dernière zone (au delà de 30min) on retient que la vitesse d'extraction devient très faible et finit par s'annuler au bout de 90 minutes.

Durant le procédé de l'extraction, le composé majoritaire Carvacrol est aussitôt évaporé de la matrice végétale et il termine de s'extraire à de faibles vitesses jusqu'à la fin de l'extraction.

4) Application de deux modèles à la cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Les fonctions pré-introduites dans le logiciel *Microcal Origin* ont permis d'adapter nos données expérimentales aux deux modèles proposés et d'en tirer les résultats portés dans le Tableau II.8 (Mouhi et al., 2015).

Les deux modèles mathématiques ont été utilisés pour étudier le mécanisme de l'extraction. Chaque modèle exprime le rendement de l'extraction en fonction du temps par une équation simple (c'est-à-dire une solution analytique d'équations basiques), qui contient seulement deux ou trois paramètres réglables, ayant chacun une signification physique claire. L'alignement (*Curve fitting*) des données expérimentales par les deux modèles est illustré dans les figures II.12 (1-2).

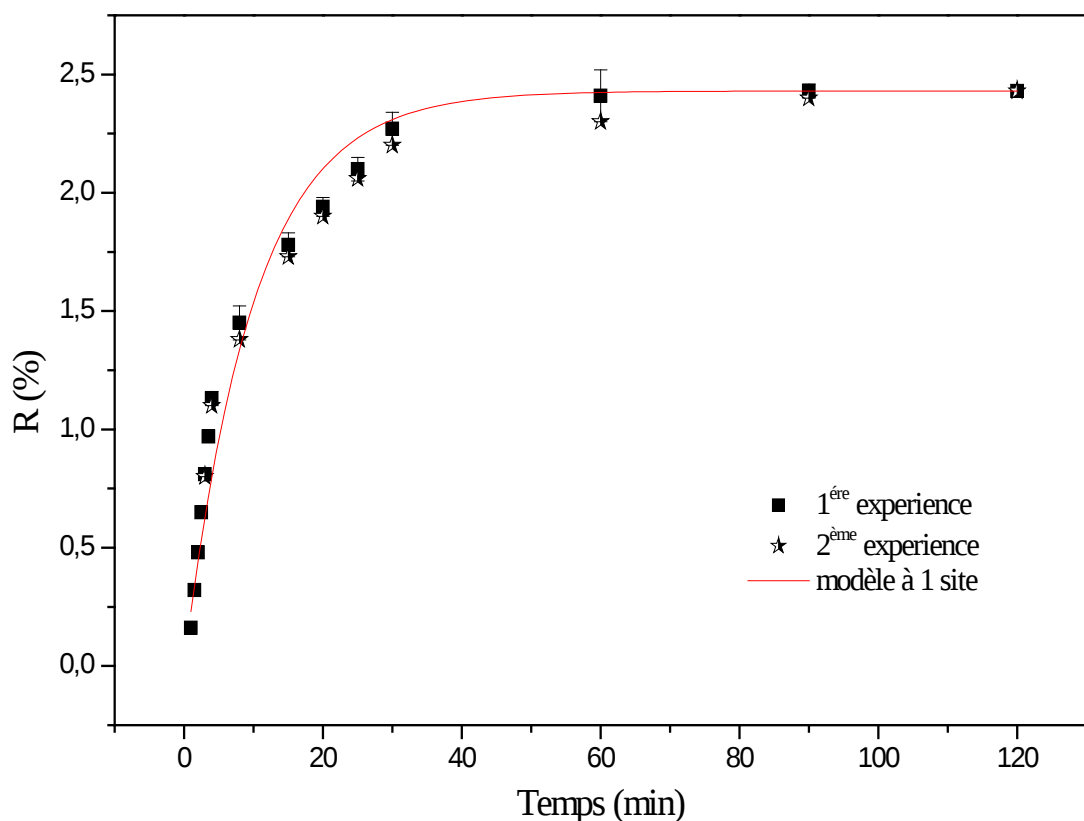


Figure II.12.1. Application du modèle du site unique à la cinétique d'extraction de l'HE.

D'après la figure II.12.1, on constate que le modèle du site unique peut s'appliquer à nos données expérimentales. La courbe est cohérente avec les valeurs expérimentales. Ainsi, le modèle peut décrire le mécanisme d'extraction de l'HE de *Thymus fontanesii*.

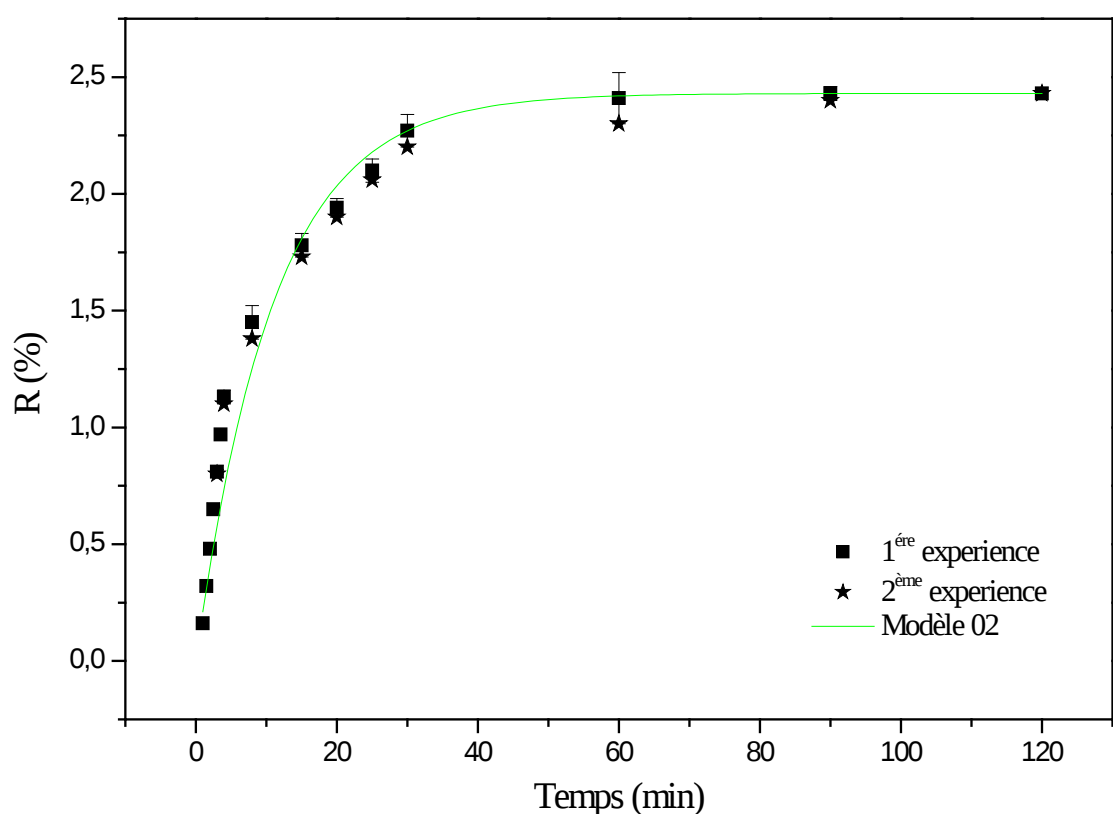


Figure II.12.2. Application du modèle de deux sites à la cinétique de l'extraction de l'HE de *Thymus fontanesii*

En ce qui concerne le modèle de désorption à deux sites, les valeurs de k_1 et k_2 ont été déterminées en ajustant les données expérimentales. Les coefficients du modèle à deux sites ; k_1 , k_2 et R_∞ sont également illustrés dans le Tableau II.8. Le coefficient de régression calculé est supérieur à 97%, ce qui rend ce modèle plus adéquat que le premier pour prédire la cinétique de l'extraction de l'HE.

L'erreur cumulée entre les tracés et les points expérimentaux est de 2.577 pour le modèle du site unique contre 1.04 pour le second modèle.

Tableau II.8. Constantes des deux modèles appliqués à la cinétique de l'extraction de l'HE de *Thymus fontanesii*

Site unique		Deux sites			
K	R_∞	F	k_1	k_2	R_∞
0,1	2,43	0,46	0,101	0,08	2,43
R^2	0,9642	R^2	0,9714		

Les données issues de la modélisation de l'extraction (tableau II.8) indiquent que près de la moitié du rendement (46%) se trouvent dans la fraction rapide ($f = 0.46$). Ce qui signifie que 46% de l'HE est extraite dans la première partie.

En analysant les constantes des vitesses de l'extraction, décrites dans le tableau II.8, nous remarquons que la constante de vitesse relative à la première étape est supérieure à celle obtenue dans la deuxième étape. La première étape est rapide et courte par rapport à la seconde.

Ainsi, nous distinguant la présence de deux périodes:

- Une première période rapide et courte où la constante de vitesse de l'extraction de la fraction extraite rapidement k_1 est égale à 0.101.
- Une seconde période où la constante de vitesse de l'extraction de la fraction extraite lentement k_2 est de 0.08.

Afin de bien visualiser l'ajustement des deux modèles, la figure II.13 illustre les deux modèles regroupés.

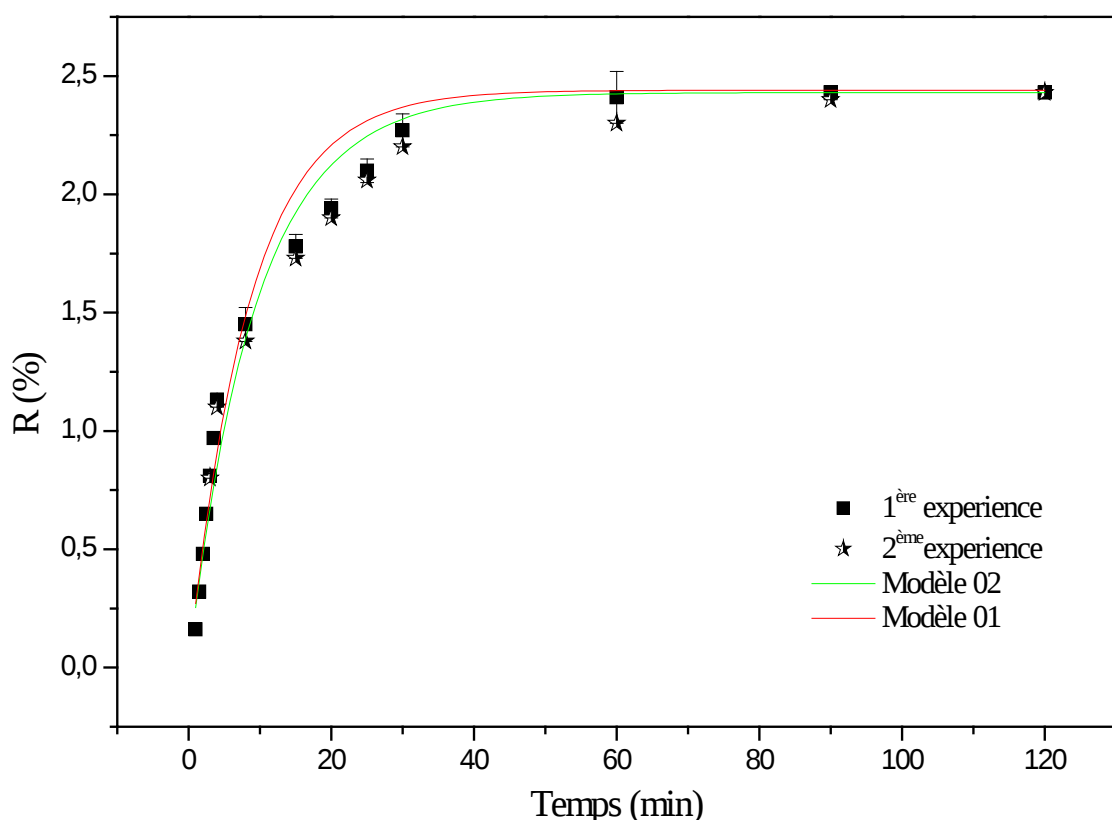


Figure II.13. Application des deux modèles à la cinétique de l'extraction de l'HE

Nous pouvons conclure que les deux modèles peuvent décrire la cinétique de l'extraction de l'HE du *Thymus fontanesii* mais que le deuxième est plus approprié.

➤ **Application des deux modèles à la cinétique de l'évolution du composé majoritaire (Carvacrol)**

Afin de comparer la cinétique de l'extraction du composé majoritaire Carvacrol avec celle obtenue pour la totalité de l'HE, les deux modèles mathématiques ont été appliqués et sont regroupés dans la figure II.14.

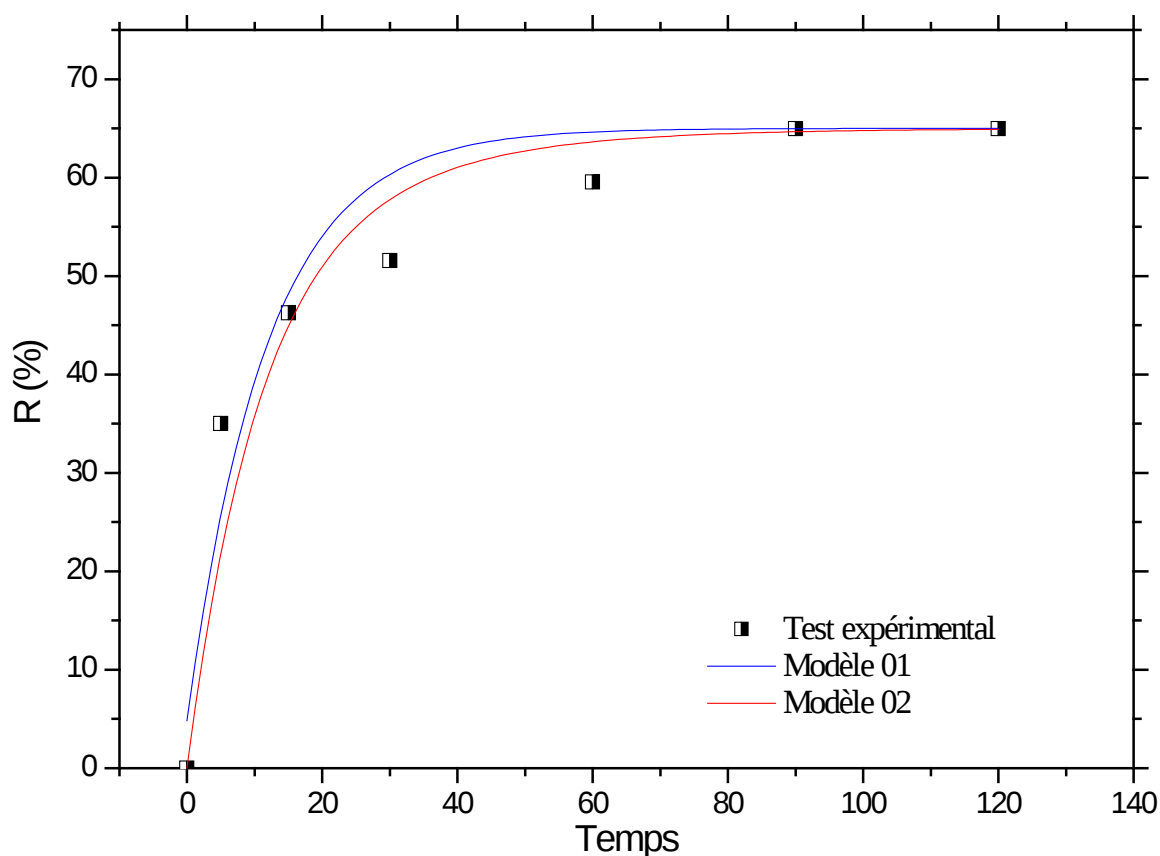


Figure II.14. Application des deux modèles à la cinétique de l'évolution du Carvacrol.

D'après la figure II.14, on remarque que les deux modèles s'écartent des données expérimentales. L'écart est prononcé pour les points au centre par rapport aux points limites.

Néanmoins, le second modèle présente un écart moindre par rapport au premier. L'erreur cumulée entre les tracés et les points expérimentaux est de 52,05% pour le modèle du site unique et de 33,98% pour le second modèle.

Par contre, il est à remarquer que les écarts tendent à s'effacer lorsqu'on atteint la dernière étape de l'extraction.

Les constantes des deux modèles sont regroupé le tableau II.9.

Tableau II.9. Constantes des deux modèles

Site unique		Deux sites			
K	R_{∞}	F	k_1	k_2	R_{∞}
0,098	64,98	0,71	0,09	0,045	64,98
R^2	0,925	R^2	0 ,937		

D'après ce tableau, on constate que la fraction rapide est de 71% et que la constante de vitesse relative à la première étape est supérieure à celle obtenue pour la deuxième étape (0,09 contre 0,045).

5) Localisation des organes de sécrétion de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Afin de localiser les tissus sécréteurs de l'HE de *T. fontanesii*, des observations à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) (JOEL JSM-6360) ont été réalisées.

Les observations par microscopie électronique à balayage ont montré que les feuilles du *Thymus fontanesii*, (figure II.15), contiennent des poils glandulaires exogènes se présentant sur les deux faces de la feuille. Ces poils sont composés des glandes pluricellulaires produisant l'HE.

La position des sites sécréteurs uniformes situés à la surface de la matrice végétale traduit l'extraction rapide des HE's.

➤ Analyse d'images et facteur forme

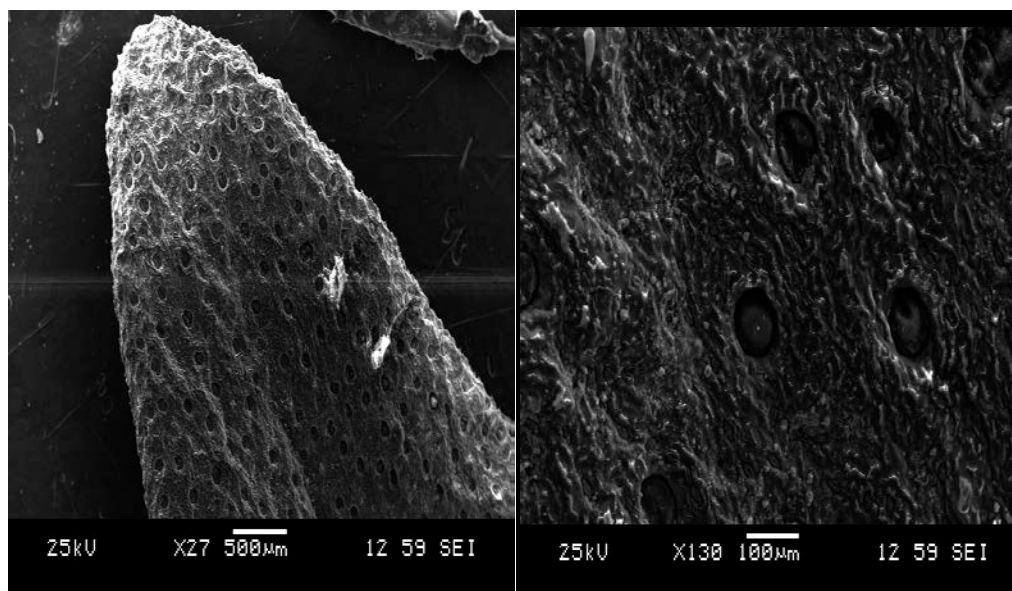
Les images obtenues par MEB sont analysées par le biais du logiciel ImageJ® (Figure II.16).

A l'aide du logiciel de l'analyse d'images, on tire la valeur du facteur forme. Ce dernier est illustré dans le tableau II.10.

Tableau II.10. Valeur du facteur forme.

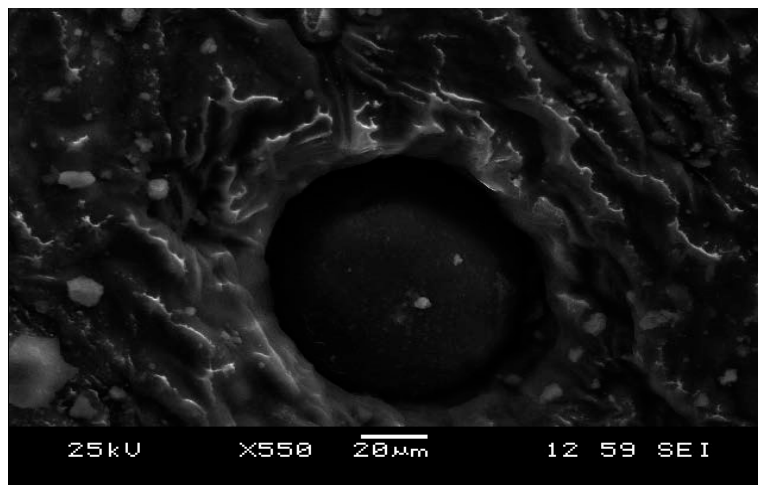
Surface (mm ²)	Sphéricité
0,006	0,901

La sphéricité de la poche sécrétrice de l'HE étant de 0,901, elle se rapproche de la sphère équivalente ayant un facteur de circularité égale à 1, d'où la confirmation de l'hypothèse que les sites sécreteurs sont sous forme de sphères.



(a)

(b)



(c)

Figure II.15. Feuilles de thym observées par microscopie électronique à balayage; (a): avec un grossissement $\times 27$, (b): avec un grossissement $\times 130$, avec un grossissement $\times 550$.

La dernière photographie (figure II.15 (c)), représentant une poche sécrétrice, a été analysée par le logiciel ImageJ® d'où l'illustration ci-contre.



Figure II.16. a) Poche sécrétrice observée par microscopie électronique à balayage
b) Détection des contours de la poche sécrétrice et analyse de l'image

6) Caractérisation de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

6.1. Caractéristiques organoleptiques et propriétés physico-chimiques

Les propriétés organoleptiques et chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité des HE's.

Nos essais sont déterminés selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par AFNOR.

L'HE de *Thymus Fontansii* obtenue par hydrodistillation (dans les conditions optimales) a l'aspect d'un liquide visqueux, limpide de couleur jaunâtre, d'odeur aromatique et de saveur piquante.

Les résultats des analyses physico-chimiques sont portés dans le tableau II.11 et comparés à la référence des données «Normes AFNOR» .

Tableau II.11 : Propriétés physico-chimiques de l'HE de *Thymus fontanesii*

Propriétés	HE	Normes AFNOR
Densité de 20 à 25°C	0,938	0,915-0,935
Indice de refraction à 20°C	1,502	1,490-1,504

On remarque que les moyennes des paramètres de l'échantillon entrent dans les fourchettes établis par les normes AFNOR .

Les paramètres physico-chimiques diffèrent suivant l'origine de la plante. Ainsi une HE extraite d'une région différente n'aura pas les mêmes caractéristiques. Ils sont influencés par les conditions climatiques et les conditions de cultures de la plante.

Par conséquent, il est logique que nos résultats soient différents à ceux trouvés par Mebarki. (2010) et Haddouchi et al. (2009).

6.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Le chromatogramme obtenu par l'analyse GC/MS de l'HE de *Thymus fontanesii* est représenté par la figure II.17.

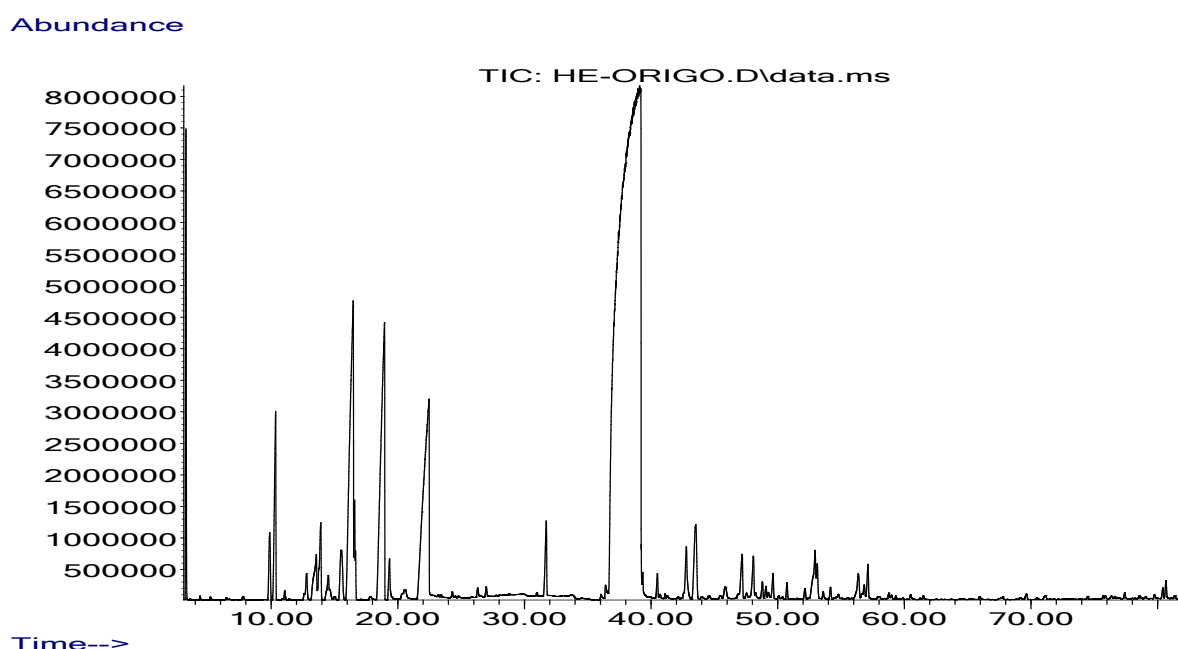


Figure II.17. Chromatogramme de l'HE de *Thymus fontanesii*

Par cette analyse chromatographique, nous avons identifié 37 composés qui représentent environ 95,9% de la composition chimique de l'HE total de *Thymus fontanesii* (Tableau II.12).

La composition chimique est dominée par un composé majoritaire le Carvacrol (66,3%). L'isomère du Carvacrol, le thymol, est estimé à seulement 0,159% de la composition. Ce qui permet de noter que l'HE de l'espèce de thym étudiée est à chémotype Carvacrol.

Les autres composés présents avec des teneurs appréciables sont : p-cymène (6,275%), γ -terpinène (6,061%), linalool (6,438%), α -pinène (1,624%) et le β -Caryophyllène (1,176%)

Tableau II.12. Composition chimique de l'HE de *Thymus fontanesii*

N°	Composé ^a	RI ^b	Pourcentage (%)
Monoterpènes Hydrocarbonés			16.50
1	α -Thujene	953	0.59
2	α -Pinène	958	1.62
3	β - Pinène	983	0.22
4	Myrcène	992	0.64
5	α -Phellandrene	1004	0.09
6	α -Terpinène	1116	0.38
7	p-Cymene	1029	6.27
8	Limonene	1031	0.54
9	γ -Terpinène	1064	6.06
10	Terpinolene	1088	0.09
Monoterpènes Oxygénés			71.05
11	1,8-Cineole	1032	0.17
12	trans-Sabinene hydrate	1070	0.34
13	Linalool	1114	6.43
14	Borneol	1168	0.06
15	Thymol	1313	0.16
16	Carvacrol	1320	63.72
17	Eugenol	1376	0.17
Sesquiterpène Hydrocarbonés			3.95
18	α -Gurjunene	1412	0.62
19	β -Caryophyllène	1424	1.17
20	Allo-aromadandrène	1461	0.18
21	Germacrène D	1483	0.49
22	β -Cubebène	1483	0.50
23	Bicyclgermacrene	1497	0.44
24	β -Bisabolène	1509	0.14
25	γ -Cadinène	1513	0.09
26	δ -Cadinène	1523	0.20
27	α -Caryophyllène	1541	0.12
Sesquiterpène Oxygénés			1.83
28	Spathulenol	1578	0.71
29	Caryophyllene oxide	1583	0.30
30	Ledol	1598	0.09
31	Tau-Cadinol	1639	0.34
32	β -Eudesmol	1649	0.12
33	α -Cadinol	1653	0.27
Autre composés oxygénés			2.00
34	1-Octen-3-ol	991	0.74
35	3-Octanone	993	0.19
36	3-Octanol	1002	0.28
37	Carvacrol, methyl ether	1244	0.67

^a Composés de l'HE classés selon la famille sur colonne apolaire HP-5MS

^b Indices de rétention sur colonne non-polar HP5MS™

La composition chimique de l'HE de l'espèce de thym étudiée est à forte prédominance de la fraction monoterpénique (p-cymene, γ -terpinène, linalool, α -pinène, etc...) par rapport à la

fraction sesquiterpénique (β -Caryophyllène et α -Gurjunène). D'autre part, elle est caractérisée par de très fortes teneurs en monoterpènes oxygénés (71,05%), alors que les monoterpènes hydrocarbonés sont présents en faibles quantités (16,50%).

Ces résultats sont en accord avec les travaux décrivant d'autres HEs, dans lesquels les composants majeurs peuvent représenter jusqu'à 95 % de l'HE, alors que les autres composés sont présents en faibles quantités (Bauer et al., 2001).

Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs (Shabnum & Wagay, (2011); Fachini-Queiroz et al. (2012). Ces derniers indiquent que l'HE présente un taux élevé en phénols. Ils exposent aussi que des monoterpènes hydrocarbonés (*p*-cymène et terpinène) sont également présents avec une quantité appréciable.

Par contre, nos résultats ne sont pas en accord avec ceux décrits par Dob et al. (2006) et par Ghannadi et al. (2004), de l'HE issue de la partie aérienne de la même plante récoltée dans les provinces de Djelfa et de Sétif (Algérie) où le composé majoritaire est le thymol avec une proportion de 29,3% et 67,8%, respectivement. De même, il existe une différence importante en ce qui concerne les autres composés.

Néanmoins, nos résultats sont comparables à ceux établis par Bekhechi et al. (2007) pour la région de Tlemcen (Algérie) avec des proportions en Carvacrol allant de 66,7 jusqu'à 69,5% et ce dans quatre emplacements différents de la région.

De même une proportion de 68,5% en Carvacrol a été déterminé par Sahraoui et al. (2016) pour la région d'Aïn Defla sur le *Thymus pallezens*.

Du lieu où poussent les Lamiacées dépendra la composition biochimique de leur essence et déterminera donc le chémotype, la spécificité de l'HE et les propriétés thérapeutiques.

Tous ces paramètres sont influencés par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les pratiques culturales (Jordan et al., 2006; Fadil et al., 2014).

II.6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié un procédé de l'extraction de l'HE de *T. fontanesii* qui est l'hydrodistillation type Cleveger par l'optimisation de deux paramètres et par le suivi de la cinétique de l'extraction.

Les modèles adoptés à un seul et à deux sites sont adéquats pour décrire la cinétique de l'extraction de l'HE de cette plante. Le second modèle a révélé que la fraction extraite pendant la partie rapide représente près de la moitié (46%).

L'analyse par microscope électronique à balayage a montré que les feuilles de *Thymus fontanesii* contiennent des sites glandulaires exogènes. La position des sites de sécrétion uniformes sur la surface de la matrice végétale peut refléter la partie d'extraction rapide de l'HE.

L'analyse chromatographique a révélé l'existence d'un composé majoritaire, le Carvacrol, le monoterpène responsable de plusieurs activités biologiques et pharmacologiques qui feront l'objet du prochain chapitre.

Chapitre III.
Valorisation de l'huile
essentielle de *Thymus*
fontanesii

III.1. Objectif du chapitre

Dans ce chapitre, nous allons valoriser l'HE de *Thymus fontanesii* par l'étude de ses activités biologiques et pharmacologiques.

Nous allons évaluer les activités antioxydante, anti-inflammatoire, antipyrétique et anti-ulcéreuse de cette HE.

L'étude de la toxicité de l'HE de thym sera également réalisée dans le but de déterminer la dose létale 50 (DL50) qui définira les doses en HE (inférieures à la DL50) à utiliser pour l'estimation des activités pharmacologiques.

III.2. Introduction

Les HEs sont des sources potentielles de molécules bioactives diverses qui présentent aussi des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires et antiulcéreuses.

Les anti-inflammatoires, d'origine végétale testés, sont nombreux. En revanche, des études sur les conséquences de leur utilisation sont rarement complétées, en particulier sur la tolérance chez les patients présentant un ulcère gastroduodéal évolutif.

Dans ce contexte, l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire ainsi que l'estimation de son effet sur la muqueuse gastrique sera d'une grande importance.

III.3. Travaux antérieurs

a) Activité biologique (activité anti-oxydante)

Les plantes médicinales présentent des propriétés curatives grâce à l'action de leurs principes actifs. Extraits végétaux, les essences naturelles peuvent aussi présenter des activités biologiques remarquables. De nombreux auteurs se sont attachés à l'étude des HEs, tant sur le plan chimique que sur le plan de leurs activités biologiques.

Dorman et al. (2003), ont extrait par hydrodistillation des HEs de quatre plantes appartenant à la famille des Labiées qui sont l'origan, le romarin, la sauge et le thym. Leurs études sur trois radicaux libres ont montré que le degré observé de l'activité antioxydante dépend de l'essai utilisé et que le thym présente le plus faible pouvoir antioxydant comparé aux autres plantes.

b) Activités pharmacologiques

Les HE's peuvent être utilisées, également en milieu clinique pour soigner diverses maladies comme les maladies inflammatoires et ulcéreuses.

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique. Elle a pour but d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste

du fait de l'agressivité de l'agent pathogène et de sa persistance. Cependant, l'utilisation des substances chimiques de synthèse anti-inflammatoires est accompagnée toujours d'effets secondaires indésirables.

Les tannins isolés de l'écorce d'*Allacardiunl occidentale*, utilisés en médecine populaire dans certaines traditions africaines ont montré une action anti-inflammatoire chez le rat par voie orale et intra-péritonéale (Pousset, 1989).

Les extraits d' *Harpagophytum procumbens* et d' *Harpagophytum zeyheri*, administrés par voie intra péritonéale chez le rat, ont montré un effet anti-inflammatoire dose-dépendant vis-à-vis de l'œdème de la patte du rat induit par la Carragénine (Fleurentin & Hayon., 2007).

L'ulcère gastrique est une perte de substances plus ou moins profondes de la muqueuse stomacale. La maladie de l'ulcère gastrique et duodénal a connu une révolution dans son traitement durant les 20 dernières années et ce depuis la découverte d'*Helicobacter pylori* par Marshall et Warren, son incidence semble être en diminution marquée ces dernières années (Conférence de consensus *helicobacter pylori*, 1999). Plusieurs travaux ont été menés sur cette pathologie.

De nombreux travaux ont démontré que les plantes utilisées traditionnellement comme cicatrisantes possèdent des propriétés d'activation du système immunitaire. Cette activation serait le mécanisme de guérison des plaies et de l'ulcère gastroduodénale (Inngjerdingen et al., 2005).

En ce qui concerne de l'activité antipyrétique des HEs, il existe peu de travaux dans la littérature. On cite les travaux d'Amouzoun et al. (2008), qui ont évalué l'activité antipyrétique de l'extrait hydro-alcooliques des racines et feuilles de *Nauclea latifolia Smith* récoltée à Agou, une localité située au nord-ouest de Lomé (Togo). Ces auteurs ont démontré que cet extrait réduisait de façon significative l'hyperthermie provoquée par la levure de bière chez les rats, ce qui explique l'usage traditionnel de cette plante.

III.4. Matériels et méthodes

1) Animaux

Les animaux utilisés sont des souris males de souche Swiss albino, pesant entre 20 et 25g et des rats males de souche Wistar pesant entre 220 et 250g. Tous les animaux sont délivrés par l'Institut Pasteur d'Alger et sont de statut sanitaire EOPS (Exempts d'organismes pathogènes spécifiques).

Ces animaux ont un accès libre à l'eau *ad libitum* et à la nourriture (croquettes provenant de la société de production des aliments d'animaux, Bouzaréa, Alger). Ils sont maintenus dans

des conditions de température comprises entre 20 et 24°C et soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h et d'un taux d'humidité de 45 à 50%.

2) Evaluation de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles

L'activité anti-oxydante de l'HE de *Thymus fontanesii* a été évaluée par le biais de deux méthodes.

➤ Evaluation de l'activité anti-oxydante par le 2,2- Diphenyl -1- picryhydrazyl (DPPH)

Le piégeage des radicaux libres est le principal mécanisme suivant lequel les antioxydants agissent dans les aliments. La capacité de donation des électrons par les HEs ou par les extraits, est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique en suivant la disparition de la couleur violette d'un solvant polaire comme l'éthanol contenant le radical libre DPPH (2,2- Diphenyl -1- picryhydrazyl) à température ambiante.

Dans ce test, le piégeage du radical DPPH est suivi par la diminution de l'absorbance à 517 nm qui est due à la réduction du radical par l'antioxydant contenu dans les échantillons.

Pour cela on a préparé 100 ml d'une solution 60 µm de DPPH ce qui correspond approximativement à 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de solvant (dans notre cas c'est l'éthanol).

Le test du DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par Burits et Bucar (2000). Le réglage du Zéro s'effectue avec le solvant pur (éthanol).

Pour un échantillon donné et une concentration donnée, on procède comme suit: on prélève 975µl de la solution de DPPH et on mesure son absorbance A_0 . Puis, on lui ajoute 25µl de la solution d'échantillon. On laisse le mélange incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et on mesure son absorbance A_t ($t=30$ minutes). L'activité anti-oxydante ou le pouvoir antioxydant est donné l'équation (III.1);

$$A\% = 100 \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \quad (III.1)$$

➤ Evaluation de l'activité anti-oxydante par la méthode du pouvoir réducteur

L'aptitude des HEs et des composées phénoliques à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure- Fe^{+3} en fer ferreux, est évaluée par la méthode décrite par Oyaizu (1986).

L'estimation du pouvoir réducteur de l'HE est obtenue comme suit; 0,125 ml d'HE sont mélangés avec une solution tampon phosphate (2,5 ml, 0,2 M, pH 6,6) et le potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$; 2,5 ml, 1%]. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 minutes. 2,5ml d'acide trichloroacétique (10%) sont ajoutés et centrifugés pendant 10 minutes à 3000

tr/min. Finalement, 2,5ml de la phase supérieure sont prélevés et mélangés avec 2,5 ml d'eau distillée et de chlorure ferrique FeCl_3 (0,5 ml, 0,1% w/v). L'absorbance est mesurée à 700 nm. Une augmentation dans l'absorbance signifie une augmentation du pouvoir réducteur.

3) Etude de la toxicité aiguë: détermination de la dose médiane (DL_{50}) de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

La DL_{50} représente la dose unique déduite statistiquement censée provoquer la mort de 50% des animaux auxquels la substance a été administrée.

Le principe consiste en l'administration des doses croissantes du produit à analyser à plusieurs lots d'animaux réparti d'une manière homogène. Le nombre de mortalité, se fait tous les jours et ce durant 14 jours qui suivent l'administration.

La DL_{50} est représentée en poids de l'HE rapporté à l'unité de poids corporel des animaux soumis à l'expérimentation (mg/kg). (Miller et al., 1944).

Dans notre étude, nous avons injecté plusieurs doses. Pour cela les souris sont séparées en 6 lots de 6 souris (constitués de la façon la plus homogène possible) préalablement mis à jeun pendant 17 heures et reçoivent par gavage respectivement des doses de : 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5g/kg et 3g/kg du produit à tester (HE).

On a privé les animaux de la nourriture pendant 3 à 4 heures après l'administration du produit.

Selon Vialo, (1998), pour une substance administrée par voie orale, on considère que le produit est extrêmement toxique si la DL_{50} est inférieure à 5 mg/kg; très toxique si la DL_{50} est comprise entre 5 et 50 mg/kg; toxique si la DL_{50} est comprise entre 50 et 500 mg/kg; peu toxique si la DL_{50} est comprise entre 0.5 et 5 g/kg; pas toxique ou très peu si la DL_{50} est supérieure à 5 g/kg.

4) Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

L'activité anti-inflammatoire de l'HE de *Thymus fontanesii* a été évaluée par le moyen de deux méthodes.

➤ Œdème de la patte induit par la Carragénine

Cette étude a été effectuée au laboratoire de pharmaco-toxicologie du Centre de Recherche et de Développement (CRD) du groupe SAIDAL.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en mesurant l'œdème induit par la Carragénine selon la méthode de Winter et al. (1962). L'inflammation a été provoquée

par l'injection de 0,1 ml d'une solution de Carragénine (1% w/v) dans une solution saline isotonique sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche des souris. Le lot essai a été traité oralement par l'HE de *Thymus fontanesii* à une dose de 500mg/kg (0,5 ml par animal) trente minutes avant l'injection de la Carragénine. Le lot référence a reçu le Diclofenac à la dose de 50 mg/kg tandis que le lot témoin n'a reçu qu'une solution saline isotonique 0,2% Tween 80 dans du NaCl à 0,9%.

Le volume des pattes gauche et droite de chaque souris a été évalué avant et quatre heure après l'administration de la Carragénine en utilisant la méthode de l'analyse d'images (Figure III.1). Le pourcentage de l'inhibition a été calculé selon la relation donnée par l'équation III.2;

$$\% \text{ Inhibition} = 1 - \frac{\Delta v_t}{\Delta v_c} \times 100 \quad (\text{III.2})$$

Avec; Δv_t représente la différence des surfaces des pattes des groupes traités.

Δv_c représente les différences des surfaces des pattes du groupe contrôle.

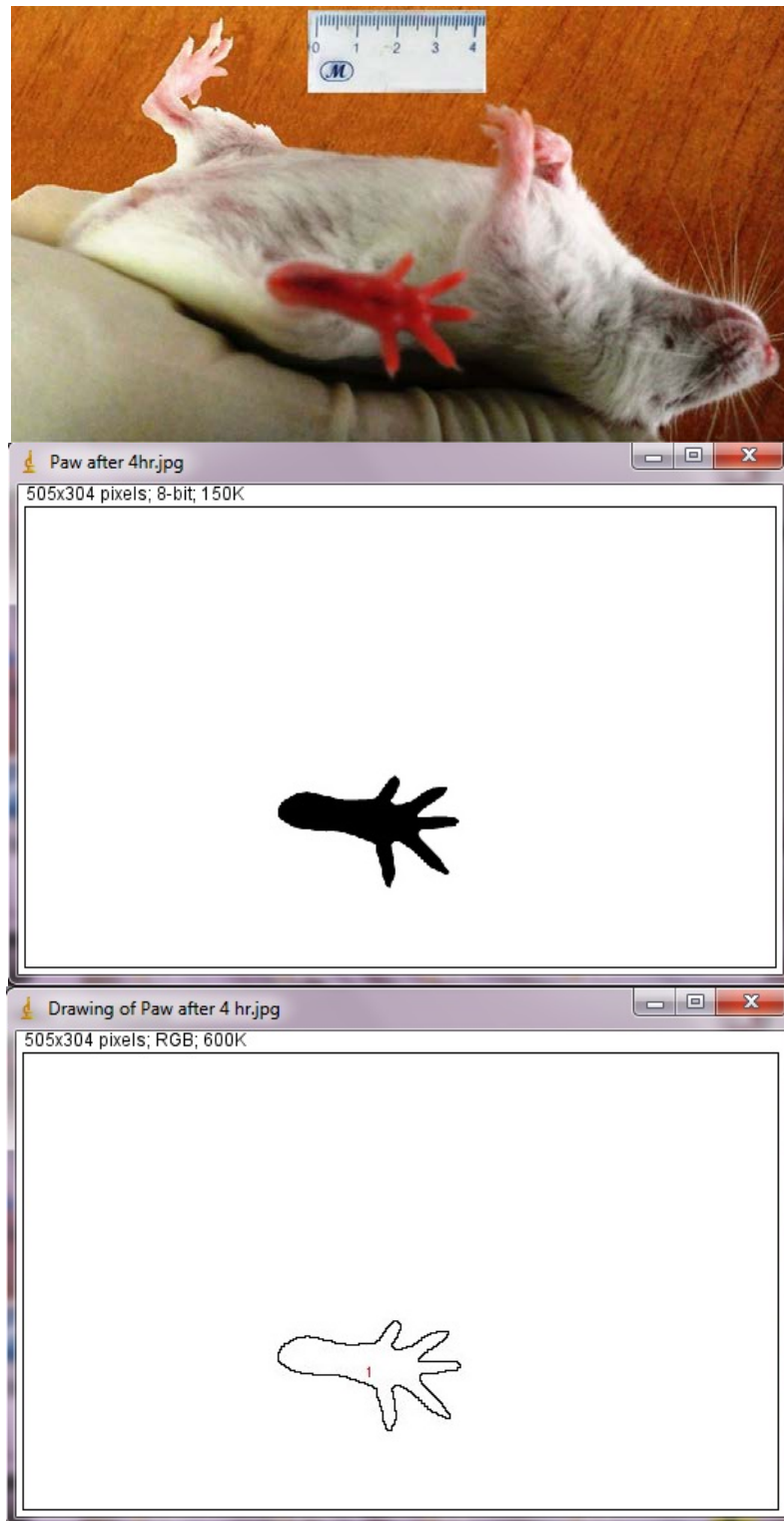


Figure III.1. Détermination des surfaces des pattes par analyse d'images

➤ **Œdème de l'oreille induit par le 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)**

Dans cette étude l'œdème de l'oreille a été évalué par la méthode décrite par Young & De Young. (1989).

Quatre groupes de six souris ont été formés, l'œdème a été produit sur l'oreille droite de chaque animal par injection locale de 2,5 µg de 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) dans 20 µl d'acétone (injection de 10 µl dans chaque oreille).

L'HE dans l'acétone a été appliquée localement et juste après le TPA en doses uniques de 3 et 10 mg/oreille. L'oreille gauche de la souris a été utilisée comme témoin et a reçu de l'acétone. L'Indométhacine dans l'acétone a été utilisé comme référence (0,5 mg / oreille).

Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale quatre heures après l'injection.

Des disques de 6mm de diamètre de chaque oreille ont été prélevés pour les peser.

L'activité anti-inflammatoire a été exprimée en pourcentage de l'inhibition de l'œdème chez les souris traitées, par rapport au groupe témoin selon la formule III.3 suivante;

$$\% \text{ inhibition} = \left(\frac{\text{Différence de poids du groupe témoin} - \text{Différence de poids du groupe traité}}{\text{Différence de poids du groupe témoin}} \right) \times 100 \quad (\text{III.3})$$

5) Evaluation de l'activité antiulcéreuse de l'huile essentielle de *thymus fontanesii*

L'étude de l'activité antiulcéreuse consiste à provoquer de manière expérimentale l'ulcère gastrique chez les animaux de laboratoire avec différents agents ulcérogènes comme les AINS et l'alcool. L'effet gastro-protecteur de l'HE de *Thymus fontanesii* a été déterminé par la méthode de l'ulcère induit par l'éthanol.

Cinq groupes de six rats sont formés, ils sont mis à jeun 17 heures avant l'expérimentation avec accès libre à l'eau *Ad libitum*. Les rats traités reçoivent un volume de 0,2 ml de l'HE de *T. fontanesii* d'une concentration de 250 et 500 mg/kg (groupe 1 et 2).

Le groupe témoin négatif reçoit une solution aqueuse (groupe 3).

Le groupe témoin positif reçoit de l'omeprazole à une dose de 20mg/kg (groupe 4).

Le groupe normal ne reçoit qu'une solution aqueuse (groupe 5).

Toutes les solutions sont préparées dans 0,9% NaCl, contenant 0,1% de Tween 20, comme véhicule.

Une heure après l'administration des solutions, tous les groupes reçoivent par voie orale 0,1 ml d'éthanol à 95% pour l'induction des lésions gastriques, excepté le groupe normal (groupe 5).

45 minutes plus tard, les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale. Les estomacs sont lavés avec une solution physiologique et ouvert le long de la courbure puis fixés entre deux plaques de verre.

Les images de chaque estomac ont été photographiées et la surface des lésions gastriques ont été déterminées par analyse d'images (logiciel ImageJ®) et les données ont été exprimées en cm² (Figure III.2). L'évaluation gastro-protective a été présentée sous la forme d'un pourcentage d'inhibition (I%) calculé selon la formule III.4;

$$\%Inhibition = \left(\frac{\text{Surface d'ulcère}_{\text{control}} - \text{Surface d'ulcère}_{\text{traité}}}{\text{surface d'ulcère}_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad (\text{III.4})$$

Chaque tissu gastrique a été coupé en morceaux et traité pour des études histologiques ultérieures.

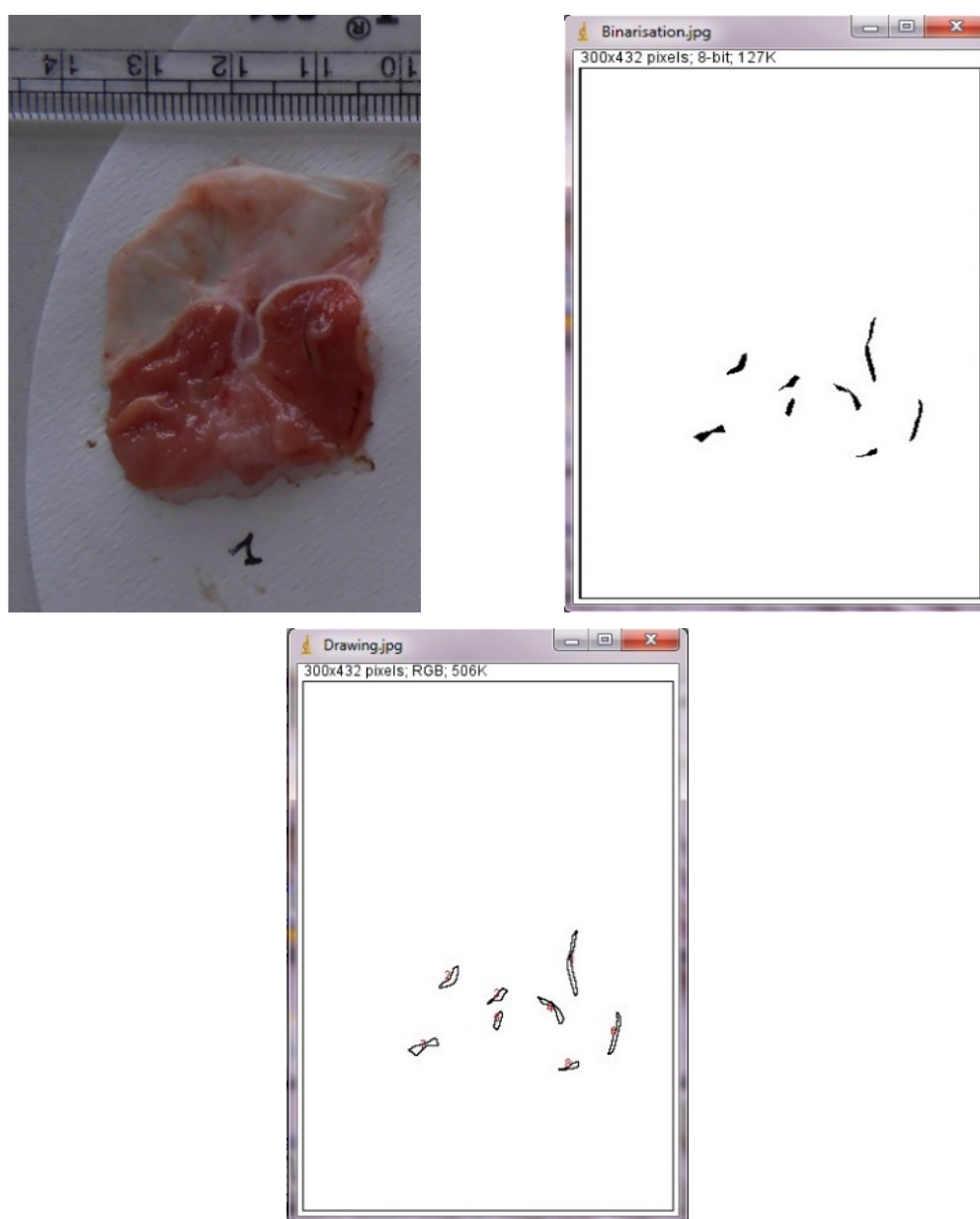


Figure III.2. Détermination des surfaces des lésions ulcéreuses par traitement d'images

➤ **Analyse histologique**

Pour l'évaluation histologique, une petite portion de l'estomac (fixée dans du formol à 2%) a été incorporée dans de la cire de paraffine, sectionnée en sections sagittales de 5 μ M et colorée avec de l'hématoxyline-éosine. Une zone représentative a ensuite été sélectionnée pour une analyse qualitative en microscopie optique.

6) Evaluation de l'activité Antipyrétique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

L'hyperthermie est induite chez les rats par administration sous cutané, au niveau de la région dorsale d'une suspension aqueuse de la levure de bière à 20% à la dose de 20 ml/kg (Mouhi et al., 2015).

Les rats sont mis à jeun pendant 24 heures. Les températures rectales témoins sont mesurées 18 heures après l'injection de la levure de bière en utilisant un thermomètre électronique (Thermoval®). Seuls les rats qui ont montré une élévation de température d'au moins 0.7°C sont retenus pour l'expérience. Deux doses des solutions pour l'HE ont été testées (100 mg/kg et 250 mg/kg). Le paracétamol à 50 mg/kg est utilisé comme produit de référence. L'eau physiologique est utilisée comme témoin négatif. La température rectale est prélevée à 60, 120, 180 et 240 minutes après l'administration des substances.

7) Analyse statistique

Les résultats des expériences sont présentés sous forme des moyenne arithmétique (M) des valeurs obtenues $\pm$ l'écart moyen (SEM) [M $\pm$ SEM].

Les valeurs des IC50 sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentration)].

Le test t de *Student* est utilisé pour évaluer la signification des effets des différentes substances testées, ou l'analyse de la variance (one way ANOVA) suivie par le post-test de Turkey-Kramer par le logiciel Stat Graphique. La différence est considérée statistiquement significative au risque 5% ($p < 0.05$).

III.5. Résultats et discussions

1) Activité anti oxydante de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

L'activité anti oxydante a été évaluée par deux tests, celui du piégeage des radicaux libres par le DPPH et le test de l'évaluation du pouvoir réducteur du fer ferrique du complexe ferricyanure Fe^{+3} en fer ferreux.

1.1) Evaluation de l'activité anti oxydante de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* par la méthode de DPPH

L'effet des antioxydants sur le piégeage de radicaux DPPH est dû à leur aptitude à donner de l'hydrogène. Une activité de piégeage des radicaux DPPH élevée est associée à des valeurs de concentration d'inhibition (IC_{50}) inférieures.

L'activité anti oxydante de l'HE est exprimée par la valeur de la concentration d'inhibition IC_{50} , qui définit la concentration efficace des substrats qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). Ces IC_{50} sont calculées à partir de l'algorithme de régression linéaire du graphique, qui a été représenté en tant que pourcentage d'inhibition par rapport à la concentration de l'HE ou celle de la référence utilisée. Ces valeurs ont été exprimées en milligrammes d'extrait par millilitre de solution d'éthanol.

La figure III.3. Représente l'évolution du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations en HE et en BHT.

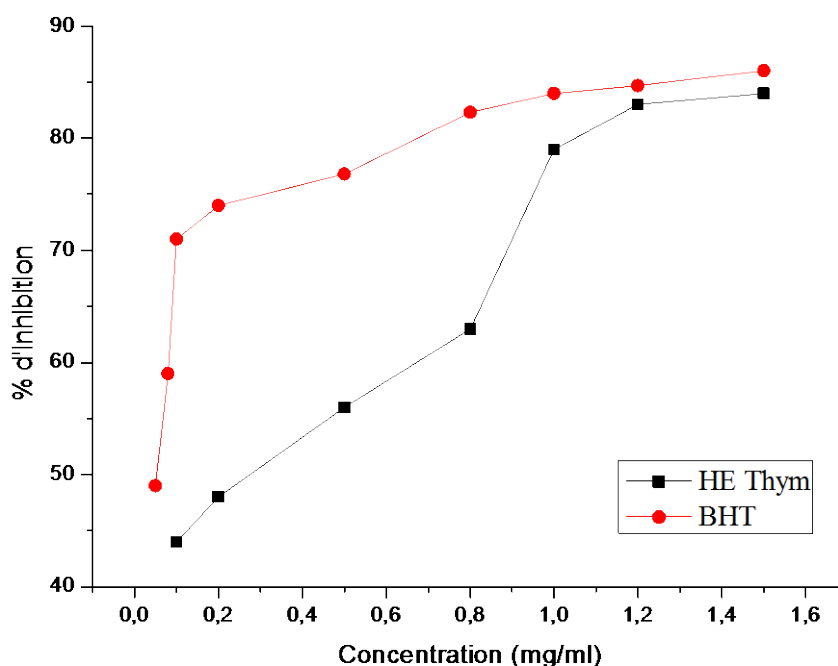


Figure III.3. Evolution du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations

D'après la figure III.3, on remarque que l'HE du thym a un pourcentage d'inhibition inférieur à celui de l'antioxydant de synthèse BHT. Il apparaît que cette huile présente une capacité de réduction du radical DPPH relativement élevée pour les concentrations supérieures ou égale à 0,8 mg/ ml.

Pour l'antioxydant de référence, BHT, il présente une activité de piégeage du radical DPPH nettement supérieur à celle de l'HE et ceci pour des faibles concentrations. En outre, l'HE de *Thymus fontanesii* était moins efficace ($IC_{50} = 0,27$ mg /ml) en comparaison avec le BHT ($IC_{50} = 0,056$ mg /ml).

La réduction du radical de DPPH dépend de la nature, de la structure et de la concentration des composés antioxydants (Alma et al, 2003, Kordali et al., 2005, Basile et al., 2006, Mimica- Dukic et al., 2004, Božin et al., 2006). Il peut également être affecté par la lumière, l'oxygène et le pH de la réaction (Ozcelik et al., 2003).

Il n'est pas facile d'établir l'effet spécifique de chacun des nombreux composés de l'HE et la synergie possible du mélange très complexe. Il semble possible qu'une petite concentration d'un composé spécifique puisse être essentielle pour déterminer cette activité antioxydante.

Le rôle des composés phénoliques comme piègeurs des radicaux libres est souligné dans plusieurs rapports (Komali et al., 1999; Moller et al., 1999). Par conséquent, on peut supposer que les propriétés antioxydantes des extraits peuvent être attribuées à la présence de ces composants bioactifs. Cette conclusion corrobore celle établie par Jukić, & Milos (2005) qui constate que les activités antioxydantes des HEs sont aussi élevées que la teneur en composés phénoliques.

La forte activité antioxydante de l'HE de thym peut être attribuée à sa forte teneur en carvacrol qui est un puissant agent réducteur de radical DPPH et inhibe la peroxydation lipidique. En effet, tous les auteurs s'accordent à dire que les phénols (carvacrol, thymol, eugenol...) sont les principaux composés qui favorisent cette activité.

Nos résultats obtenus pour l'HE de *Thymus fontanesii* sont faibles en termes d' IC_{50} comparativement à ceux obtenus par El Bouzidi et al. (2013) qui se sont focalisé sur des espèces de thym endémique du Maroc dont le *T. broussonetii*, *T. maroccanus* et le *T. satureioides*, avec des IC_{50} de 0,132; 0,082 et 0,167 mg/ml, respectivement.

1.2) Evaluation de l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* par la méthode du pouvoir réducteur

Cette méthode a pour principe la mesure de la capacité d'un échantillon à agir en tant que donneur d'électrons et, par conséquent, réagit avec les radicaux libres en les convertissant en produits plus stables mettant ainsi fin aux réactions en chaîne radicale.

Dans le dosage du pouvoir réducteur, la présence d'antioxydants dans l'échantillon aboutirait à la réduction de Fe_3^+ en Fe_2^+ en faisant don d'un électron. Une quantité de complexe Fe_2^+ peut alors être surveillée en mesurant la formation du bleu prussien de Perl ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) à 700 nm.

La figure III.4. Représente l'évolution de l'absorbance lue à 700 nm en fonction des concentrations en HE et en BHT.

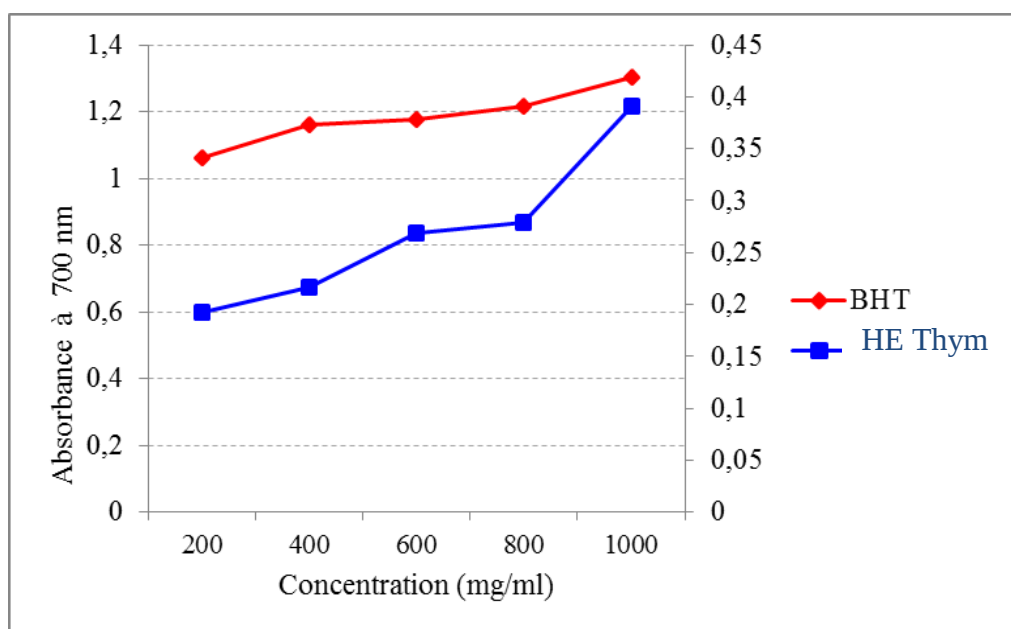


Figure III.4. Evolution de l'absorbance en fonction des concentrations en huile essentielle et en BHT.

Les résultats de l'activité antioxydante de l'HE ont révélé que le pouvoir réducteur dépend des concentrations. Le pouvoir réducteur de l'HE et du BHT (figure III.4) augmentent avec l'augmentation des concentrations des échantillons. Cependant, ils sont significativement inférieurs à ceux de la référence BHT.

L'activité antioxydante des HEs a souvent été attribuée à la présence des constituants phénoliques, en particulier le thymol et/ ou le carvacrol.

Les résultats présentés dans cette étude, peuvent contribuer à la connaissance du potentiel antioxydant des espèces de *Thymus* endémiques qui est une espèce rare car le potentiel antioxydant de l'HE de *T. fontanesii* est rapporté pour la première fois.

2) Evaluation de la toxicité aiguë: détermination de la dose médiane (DL₅₀) de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

L'évaluation de la toxicité aiguë de l'HE de *T. fontanesii* a été effectuée sur des souris par administration orale des doses croissantes en HE. L'expérience a été effectuée jusqu'à une dose de 3,0 g/ kg.

Au cours de la procédure expérimentale, on a observé qu'après 24 heures, les six animaux traités avec les doses de 2,0; 2,5 et 3,0 g/ kg ont été trouvés morts, tandis que les animaux traités avec la dose de 1,5 g/ kg ont été trouvés morts après 48 heures. Ainsi, la DL₅₀ de l'HE a été déterminée et elle est d'une valeur de $0,885 \pm 0,080$ g/ kg.

Selon la littérature, la toxicité peut être considérée comme «**faible**» lorsque la valeur de DL₅₀ est dans la plage de 0,5 à 5,0 g/ kg, comme est le cas pour l'HE de *T. fontanesii*.

3) Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'HE de *Thymus fontanesii*

3.1) Œdème de la patte induit par la Carragénine

L'œdème de la patte induit par la Carragénine est une méthode renommée par laquelle l'activité anti-inflammatoire des substances peut être estimée. L'injection de la Carragénine sous l'aponévrose plantaire des souris a engendré une augmentation du volume de la patte dépendante du temps.

L'effet de l'HE de *T. fontanesii* sur la réduction de l'œdème de la patte des souris a été comparé à celui du témoin négatif pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire sur la base du pourcentage d'inhibition du volume d'œdème de la patte.

L'inflammation est une réaction normale d'un corps en réponse à divers stimuli de nature biologique, physique ou chimique, y compris les infections et les lésions tissulaires. Cette réaction se manifeste cliniquement par la rougeur, la douleur et la fièvre et implique des médiateurs biologiques responsables de l'inflammation qui sont, entre autres, des prostanoïdes. Ces derniers sont le résultat de l'activation de la cascade d'acide arachidonique par la cyclooxygénase-2 (Cox 2). Cette enzyme est présente dans les foyers inflammatoires et est responsable de divers états physiologiques et pathologiques.

Cox 2 est exprimé lors d'une lésion tissulaire de l'inflammation en réponse à des cytokines pro-inflammatoires. Il existe une seconde isoforme, appelée cyclooxygénase-1 (Cox1) qui

produit des prostanoïdes cytoprotecteurs dans différentes fonctions de l'organisme, mais son inhibition implique une diminution de ce rôle et provoque donc des effets indésirables.

L'injection de Carragénine provoque la libération de divers médiateurs chimiques qui sont la cause principale du processus inflammatoire.

Le développement de l'œdème dû à l'injection de la Carragénine a été décrit comme un événement en deux phases (Arulmozhi et al., 2005). La première phase peut être due à l'émission d'histamine, de sérotonine et d'autres substances similaires. La deuxième phase est liée à l'activation des substances et à l'émission des prostaglandines.

L'inhibition de l'œdème par l'anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) Indométhacine à la dose de 50 mg/ kg est de 74% par rapport au témoin négatif (Tableau III.1).

Tableau III.1. Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'HE de *T. fontanesii* obtenus par la méthode de l'œdème de la patte

Groupe	Surface initiale de la patte (cm ²)± ESM	surface (cm ²)± SEM après 4 heures	Différence des surfaces des pattes (cm ²)	Pourcentage d'inhibition (%)
Témoin négatif	0,713±0,084 ^a	0,966±0,179 ^c	0,253	-
Huile essentielle 500 mg/kg p.o	0,680±0,098 ^{a, b}	0,735±0,078 ^a	0,055	78
Indométhacine 50 mg/kg p.o.	0,704±0,055 ^a	0,769±0,093 ^b	0,065	74

P.o. = Par voie orale, ESM = erreur standard de la moyenne de six échantillons dans chaque groupe
 Les moyennes dans la même colonne suivies de la même lettre majuscule sont significativement différentes (P <0.05) selon ANOVA analyse unidirectionnelle suivie du test de Tukey Multi-comparaison post-hoc

Les AINS's représentent les médicaments les plus prescrits dans le monde pour leurs propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. En fait, les AINS inhibent la Cox 2 mais ils inhibent aussi la Cox 1. Cette inhibition conduit à des troubles gastro-intestinaux et rénaux qui sont des effets secondaires des AINS, car ces médicaments ont la capacité de bloquer la Cox1.

L'HE de *T. fontanesii* à la dose de 500 mg/ kg a montré une inhibition maximale égale à 78% par rapport au témoin négatif. Cette activité anti-inflammatoire est probablement

expliquée par la diminution de l'expression de la Cox 2, ce qui implique que cette huile inhibe la Cox 2.

La capacité du carvacrol à réduire la production de médiateurs inflammatoires, tels que les prostanoïdes, a été rapportée par (hotta et al., 2010). Cela devrait être lié à l'activité anti-inflammatoire significative de *T. fontanesii*, puisque le carvacrol est son composé chimique majoritaire.

3.2) Œdème de l'oreille induit par le 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)

L'effet anti-inflammatoire induit par le 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate (noté TPA) a été évalué.

Après quatre heures de traitement par le TPA, un œdème situé à l'oreille droite de chaque souris du groupe témoin s'est formé.

Une réduction très importante de l'épaisseur de l'oreille par rapport aux souris du groupe témoin, a pu être notée pour les souris du groupe traité localement par 0,5 mg d'indométhacine; ce qui correspond à une inhibition de l'inflammation d'environ de 47,7%.

Le traitement des souris par 3 et 10 mg d'HE a induit une réduction très importante de l'inflammation par rapport aux souris du groupe témoin en fonction de la dose administrée, avec un pourcentage d'inhibition de 49,4 et 78,2 respectivement. (Tableau III.2).

Tableau III.2. Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'HE de *T. fontanesii* par la méthode de l'œdème de l'oreille induit par le TPA.

Traitement	Dose (mg/ oreille)	Oedème (mg) moyenne±S.E.M.	Inhibition (%)
Contrôle	-	11,00±1,41 ^c	-
HE de <i>T. fontanesii</i>	3	05,56±0,36 ^a	49,4
HE de <i>T. fontanesii</i>	10	02,40±0,22 ^b	78,2
Indomethacin	0,5	05,75±0,50 ^a	47,7

ESM= erreur standard de la moyenne de six échantillons dans chaque groupe
Les moyennes dans la même colonne suivies de la même lettre majuscule sont significativement différentes (P <0.05) selon ANOVA analyse unidirectionnelle suivie du test de Tukey Multi-comparaison post-hoc

Aux doses utilisées, l'HE a montré un effet inhibiteur plus élevé que l'indométhacine.

L'utilisation de TPA produit une réaction inflammatoire qui peut être représentée par une vasodilatation, l'infiltration de leucocytes polymorpho-nucléaires dans les tissus de l'oreille et

induit l'apparition de l'œdème, car il augmente l'activité de la xanthine oxydase et la peroxydation des lipides (Rahman et al., 2011).

Ces changements sont dus à l'activation de la protéine kinase C (PKC), qui favorise une augmentation de l'activité de la phospholipase A2 (PLA2) (Wang et al., 2002; Rahman et al., 2011). La PLA2 catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires conduisant à l'acide arachidonique. Ce dernier est impliqué dans la synthèse des eicosanoïdes, des prostaglandines et des leucotriènes, qui est la première étape de la réaction inflammatoire (Sato et al., 2009).

Da Silva Lima et al suggèrent que l'effet anti-inflammatoire du carvacrol peut être partiellement attribué à une action inhibitrice sur la synthèse des métabolites de l'acide arachidonique ou le blocage de leurs actions (Da Silva Lima et al., 2013).

4) Evaluation de l'activité antiulcéreuse de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Les lésions gastriques ont été évaluées en mesurant la zone de la lésion. Les résultats ont montré une augmentation des lésions gastriques dans le groupe témoin par rapport aux groupes prétraités avec une solution saline (témoin normal).

Chez les animaux prétraités avec de l'HE à 500 mg/ kg et l'oméprazole (20 mg/ kg), la zone ulcérée a été considérablement réduite par rapport au groupe témoin positif (72,4 et 61,5% respectivement).

L'HE à 250 mg/ kg avait moins d'effet gastro protecteur relativement à la dose de 500 mg/ kg et l'oméprazole, avec un pourcentage d'inhibition de 41,1 (Tableau III.3).

Tableau III.3. Effet de l'administration orale de l'HE de *Thymus fontanesii* sur les lésions gastriques induites par l'éthanol chez les rats Wistar.

Groupes	Surfaces des lésions moyennes $\pm$ E.S.M. (cm²)	Inhibition (%)
Contrôle normal	0	100
Contrôle (témoin négatif)	0,710 ^d $\pm$ 0,281	-
HE à 250mg/kg p.o	0,418 ^c $\pm$ 0,082	41,1
HE à 500mg/kg p.o	0,196 ^a $\pm$ 0,799	72,4
Omeprazole à 20 mg/kg (témoin positif)	0,273 ^b $\pm$ 0,108	61,5

ESM = erreur standard de la moyenne de six échantillons dans chaque groupe,

P.o. = Par voie orale;

Les moyennes à l'intérieur d'une même colonne suivies de la même lettre majuscule sont significativement différents (P <0.05) selon ANOVA analyse unidirectionnelle suivie du test de Tukey Post-hoc multi Comparaison.

L'éthanol est la cause principale de l'ulcère humain, car il conduit à la lésion de la muqueuse gastrique. Ces effets sont probablement dus à des actions biologiques telles que la peroxydation lipidique, la formation de radicaux libres et le stress oxydatif (Sannomiya et al., 2005).

Au sein du groupe témoin, on constate la formation de lésions gastriques induites par l'éthanol sous la forme d'une bande allongée d'hémorragies (figure III.5), dans laquelle la zone de la lésion correspond à 0,710 cm². L'HE de *Thymus fontanesii* a efficacement protégé la muqueuse gastrique de l'effet nocif de l'éthanol de manière dose-dépendante. Par son effet anti sécrétoire, l'oméprazole offrait une certaine protection à la muqueuse gastrique. Il a été largement utilisé comme inhibiteur d'acide dans le traitement des troubles liés à la sécrétion d'acide gastrique (Li et al., 2004).

Les résultats révélés par Takayama et al. (2011), ont prouvé que l'action gastro-protectrice de l'HE de la plante étudiée est proportionnelle à une augmentation de la production de mucus gastrique induite par les taux de PGE2.

La cyclo-oxygénase-1 (Cox 1) est produite dans de nombreux organes et est impliquée dans la synthèse de la PGE2 sur la muqueuse gastrique (Frolich, 1997).

L'absence des prostaglandines est généralement considérée comme responsable de l'augmentation des lésions gastriques (Mignon, 1992).

En plus de l'éthanol, les AINS sont également responsables de l'ulcère humain. Cependant, l'effet de ce mécanisme d'efficacité thérapeutique s'avère commun (Vane, 1971), à savoir l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines par la cyclooxygénase 1 (Cox1); qui reste toutefois une cause majeure de mortalité générée par leur impact indésirable (Brater, 2002; Lichtenstein et al., 1995).

L'idéal est de développer de nouveaux inhibiteurs de Cox qui maintiendraient les propriétés thérapeutiques de l'anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) sans conserver ses effets indésirables, comme c'est le cas de l'HE de *Thymus fontanesii*.

En fait, la capacité de cette huile est d'accélérer le processus de guérison de l'ulcère peut être attribuée à sa possibilité de stimuler la synthèse de PGE2. Les résultats ont été confirmés par l'examen histopathologique (Figure III.6).

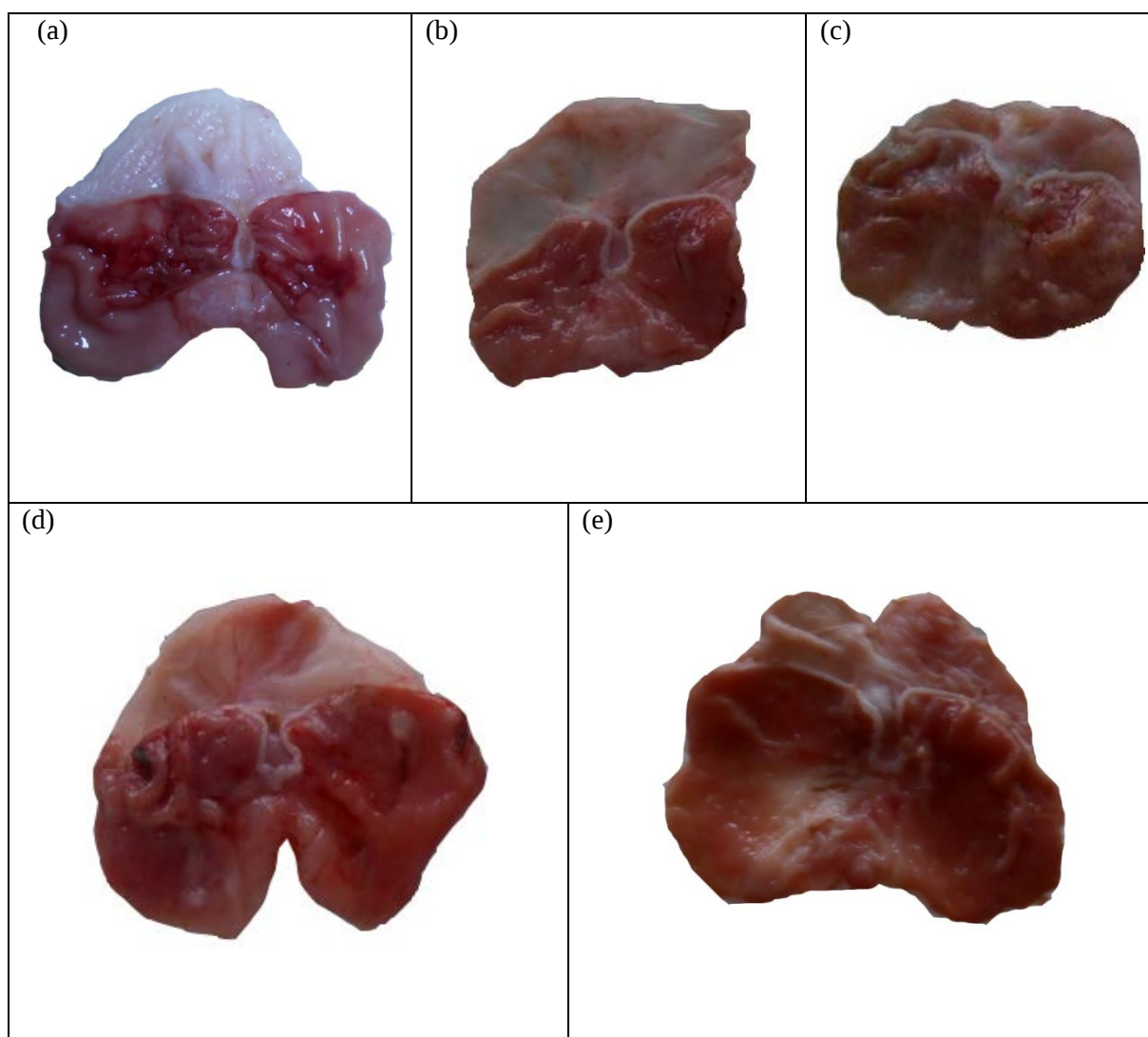


Figure III.5. Aspect macroscopique de la muqueuse gastrique; (a) contrôle (solution aqueuse à 1% de Tween-80); (b) rats prétraités avec 250 mg/kg d'huile essentielle de *Thymus fontanesii*; (c) rats prétraités avec 500 mg/kg de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*; (d) groupe témoin positif prétraité avec l'omeprazole à 20 mg/kg; (e) Représente le groupe contrôle normal; ne reçoit aucun traitement

En effet, les rats du groupe témoin (Figure III.6- image 1) ont montré une perturbation importante de l'épithélium de surface et une nécrose hémorragique, ainsi qu'une perte de la couche épithéliale, un œdème évident et une cellule d'inflammation. Cependant, les rats prétraités avec de l'HE à 250 mg/ kg (Figure III.6- image 2) et l'oméprazole à 20 mg/ kg (Figure III.6- image 4) ont montré une apparence histologique améliorée par rapport au groupe témoin. L'HE à 500 mg/ kg (Figure III.6- image 3) et le groupe non traité (Figure III.6- image 5) n'ont montré aucun ulcère dans la muqueuse gastrique et aucune inflammation n'a été observée.

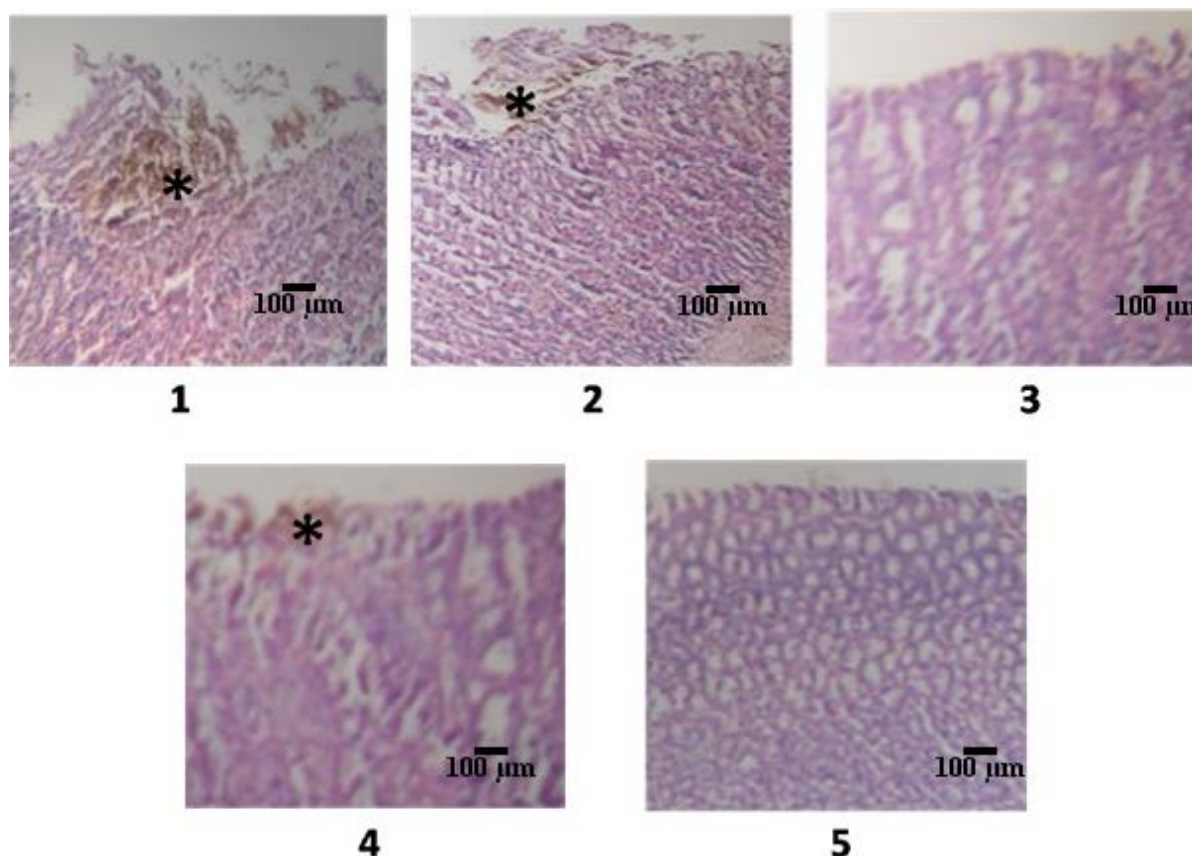


Figure III.6. Etude histologique de la muqueuse gastrique des rats; 1) contrôle (solution aqueuse à 1% de Tween-80); (2) rats prétraités avec 250 mg/kg d'HE de *Thymus fontanesii*; (3) rats prétraités avec 500 mg/kg de l'HE de *Thymus fontanesii*; (4) groupe témoin positif prétraité avec l'omeprazole à 20 mg/kg; (5) Représente le groupe contrôle normal; ne reçoit aucun traitement.*Indique une perturbation importante de l'épithélium de surface et une nécrose hémorragique. Grossissement 20× (contrôle et l'HE à 250 mg/kg), Grossissement 100× (contrôle normal) et Grossissement 150× (l'HE à 500 mg/kg et témoin positif).

Il est à noter que l'évaluation des activités pharmacologiques a fait l'objet d'une publication (Mouhi et al., 2016).

5) Activité antipyrétique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

L'injection sous-cutanée de la levure de bière à 20% a provoqué une élévation des températures chez les rats, dix-huit heures après l'induction de l'hypothermie. Le Tableau III.4 résume les résultats obtenus pour cette étude.

L'HE à 100 mg/kg a baissé de façon significative la température provoquée par l'injection de la levure de bière comparativement aux témoins.

A la dose de 50 mg/kg, l'huile s'est révélée moins active sur la baisse de la température.

A la dose de 100 mg/kg l'effet antipyrétique de l'HE est comparable à celui du Paracétamol.

Tableau III.4. Effet de l'HE de *T. fontanesii* sur l'hyperthermie provoqué chez les rats.

Lot	Dose	Température rectale (°C)					
		-18h	0h	1h	2h	3h	4h
Témoin (eau physiologique)	-	37,48±0,22	38,17±0,26	38,05±0,25	37,95±0,25	37,95±0,45	37,88±0,40
HE de <i>T. fontanesii</i>	50mg/kg	38,17±0,23**	38,9±0,17	38,93±0,24	38,82±0,28	38,43±0,25*	38,33±0,3**
HE de <i>T. fontanesii</i>	100mg/kg	37,53±0,18**	38,45±0,20	37,96±0,34*	37,8±0,33**	37,62±0,28**	37,5±0,17**
Paracétamol (Référence)	100mg/kg	37,73±0,11**	38,32±0,28	37,6±0,20**	37,55±0,22**	37,38±0,28**	37,12±0,42**

Les valeurs sont les moyennes ± l'erreur standard moyennes de six échantillons par lot;

*significativement différent à $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparé avec les températures avant injection de la levure de bière (selon ANOVA analyse unidirectionnelle suivie du test de Student).

La fièvre est un symptôme associé à plusieurs conditions pathologiques. L'hyperthermie induite par l'injection de la levure est liée à la libération des cytokines qui ayant atteint les vaisseaux sanguins stimulent la biosynthèse des prostaglandines (PGE). L'HE a réduit l'hyperthermie provoquée par l'injection de la levure de bière. Cet effet antipyrétique pourrait être dû à la réduction de la libération des cytokines et de la biosynthèse des prostaglandines.

Selon une étude menée par Aronoff et al. (2006), le paracétamol agirait en inhibant au niveau central la production de prostaglandines, impliquées dans les processus de la douleur et de la fièvre, par le biais d'une action inhibitrice sur l'enzyme prostaglandine H_2 synthase (PGHS), qui comporte notamment un site actif «cyclo-oxygénase» (ou Cox), cible de la majorité des AINS, et un site «peroxydase» (ou POX), sur lequel agirait le paracétamol. Le paracétamol n'aurait pas d'action directe sur le Cox-1 et le Cox-2 et réduit la fièvre et la douleur tout en étant dénué d'activité anti-inflammatoire.

Ces résultats concordent avec l'usage traditionnel du thym et indiquent que les principales substances actives de la plante résident dans son HE.

III.6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons exposé les résultats de l'étude des activités biologiques et pharmacologiques de L'HE de *Thymus fontanesii* récolté dans la région de Médéa, en l'occurrence l'activité anti-oxydante, anti-inflammatoire, antipyrétique et antiulcéreuse. Ces résultats ont permis de confirmer l'usage traditionnel très bénéfique de la plante.

En plus de protéger la muqueuse gastrique, L'HE de *Thymus fontanesii* a montré une bonne activité anti-inflammatoire par les deux méthodes étudiées. Par conséquent, l'HE de *T. fontanesii* est potentiellement un agent anti-inflammatoire précieux pour la prévention et le traitement des ulcères induits par l'éthanol.

Les résultats obtenus concernant la toxicité de cette HE (peu ou pas toxique), permettent la proposition de formes pharmaceutiques illimitées en usage interne et externe.

Chapitre IV. Activités biologiques de l'association des huiles essentielles

IV.1. Objectif du chapitre

Le but de ce chapitre consiste à réaliser une évaluation des activités antimicrobiennes de l'association de l'HE de thym avec l'HE de l'orange douce en premier lieu, puis avec celle de la menthe poivrée en second lieu. Ce potentiel antimicrobien sera comparé à celui des HEs prises individuellement.

IV.2. Introduction

Empiriquement reconnue depuis des siècles, la confirmation scientifique de l'activité antimicrobienne des HEs reste récente. Ces dernières années, la communauté scientifique a montré un intérêt considérable dans l'étude des nouveaux antimicrobiens végétaux.

La recherche des effets sur la synergie issue de la combinaison des HEs est d'actualité. En effet, l'activité antimicrobienne de ces associations, comme pour les associations d'antibiotiques, s'est avérée très efficace.

.

IV.3. Travaux Antérieurs

Nous allons illustrer quelques travaux réalisés sur les HEs de l'orange douce (*Citrus sinensis*), de la menthe poivrée (*Mentha piperita*) et du *Thymus fontanesii* ainsi que quelques travaux antérieurs relatifs à la combinaison des HEs.

IV.3.1. Huile essentielle de *Citrus sinensis*

L'orange est un fruit, largement cultivé dans les régions tropicales et subtropicales. L'orange douce (*Citrus sinensis*) représente l'espèce commerciale de *Citrus* la plus importante dans le monde.

➤ Techniques et procédés d'extraction

Peu de travaux ont été effectués sur l'extraction de l'HE de l'écorce de *Citrus sinensis*. Nous pouvons citer, Bousbsia., 2008; Ferhat et al., 2006; Raeissi et al., 2008.

Ferhat et al. (2006), ont réalisé une extraction de l'écorce de *Citrus sinensis* provenant de la région de Mitidja (Boufarik, Algérie) par hydrodistillation simple ainsi que par hydrodistillation assistée par micro-ondes.

Ces auteurs ont comparé ces deux techniques en termes de temps d'extraction, de rendement, de la composition chimique et des coûts du procédé. Ils ont conclu que l'extraction par hydrodistillation assistée par micro-ondes était meilleure en ce qui concerne l'économie d'énergie, le temps d'extraction (30 minutes contre 3 heures), la fraction oxygénée (11,7% contre 7,9%) et le rendement (0,42% contre 0,39%).

➤ **Composition chimique**

Cette HE contient principalement des molécules de la famille des monoterpènes qui ont des propriétés calmantes, sédatives, stomachiques, antiseptiques et toniques du système digestif.

Sovoboda et Greenway. (2003), ont montré que l'HE de *Citrus sinensis* provenant de Chine a pour composés majoritaires le limonène (93,6%) et le β -myrcène (2,0%). Les autres composés sont le dècanal (0,82%), sabinène (0,7%), α -pinène (0,4%) et le β -phelandrène (0,3%).

Des résultats similaires ont été trouvés par Sahraoui et al. (2011), dont le limonène et le β -myrcène comme composés majoritaires avec une proportion de 96,2 et 1,81%, respectivement. Les autres composés avec une faible teneur sont : α -pinène (0,6%), sabinène (0,23%), linalool (0,17%) et le dècanal (0,16%).

Les travaux de Ferhat et al. (2006), ont révélé que cette HE est composée majoritairement de limonène, β -myrcène, linalool, α -sisensal et de decanal. Ces auteurs ont montré que la technique d'extraction influe sur la composition chimique de l'HE.

IV.3.2. Huile essentielle de *Mentha piperita* L.

La menthe est une plante aromatique pouvant atteindre 80 cm de hauteur. Elle appartient à la famille des lamiacées. Sa variété la plus utilisée en phytothérapie est la menthe poivrée.

Les HEs du genre *Mentha* ont fait l'objet de nombreuses études à travers le monde. Nous citerons en particulier, les premiers travaux de Shimizu. (1973); de Lawrence. (1978) et de Kokkini. (1991) qui donnent des détails importants sur la composition chimique de diverses espèces et hybrides provenant de plusieurs origines géographiques. Ces travaux ont été suivis par ceux de Chalchat et al. (1997) et de Shahi et al. (1999).

En ce qui s'agit des travaux récents effectués sur *Mentha piperita* L., on peut citer notamment ceux de Bassolé et al. (2010) et de Moradi & Najafian. (2015).

➤ **Composition chimique**

Les composés contenus dans cette HE sont le menthol (35 à 55%) et la menthone (10 à 40%). La menthe poivrée contient en plus des HEs des flavonoïdes (lutéolme, menthoside), ainsi que des phénols et des triterpènes. Elle contient également des enzymes (oxydase et peroxydase), de la vitamine C et des acides divers (caféique, chlorogénique, férulique, fumarique).

Selon Bruneton. (1993), l'HE de la menthe poivrée (*Mentha piperita* L.), représente de 1 à 3% de la masse de la drogue sèche. Sa composition varie en fonction des facteurs multiples,

intrinsèques et extrinsèques: conditions culturelles, variations climatiques, époque de récolte...etc.

Les résultats de Bassolé et al., (2010), ont montré que l'HE a deux composés majoritaires qui sont; le menthol (39,3%) et la menthone (25,2%). Les autres composés présents avec une grande proportion sont le menthofuran (6,8%), menthyl acetate (6,7%), iso-menthone (5,3%), 1,8-cineole (4,1%) et le pulegone (1,4%).

IV.3.3. Huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Les plantes médicinales présentent des propriétés curatives grâce à l'action de leurs principes actifs. Extraits végétaux, les essences naturelles peuvent aussi présenter des activités biologiques remarquables. De nombreux auteurs se sont attachés à l'étude des HEs, tant sur le plan chimique qu'au point de vue de leur activité biologique.

Plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des HEs, en particulier leurs pouvoirs antifongiques (Soliman & Badeaa., 2002; Boukhatem et al., 2014), antibactériens (Oussala et al., 2006; Amarti et al., 2010).

Les propriétés aromatiques et médicinales du genre *Thymus* l'ont rendu très populaire dans le monde. De nombreuses études ont été réalisées sur des espèces de ce genre.

Ultee et Smid. (2001), ont montré le pouvoir inhibiteur du carvacrol, composé majoritaire dans certaines espèces de thym, contre *Bacillus cerus*. Cette bactérie provoquant très souvent des diarrhées.

Rassoli et Abyaneh. (2004), ont étudié l'effet inhibiteur des HEs du thym d'Iran (*Thymus eriocalyx* et *x-porlock*) sur les aflatoxines produites par l'*Aspergillus parasiticus*. Ils ont trouvé que le *Thymus eriocalyx* contenant 64,3% de thymol présente une activité antifongique plus importante que le *Thymus x-porlock* qui contient 30,7% de thymol.

Stylo et al. (2005), ont montré que la nature antimicrobienne des HEs est en rapport avec leur fort contenu phénolique en particulier en thymol et en carvacrol. Ils ont prouvé que plus les teneurs en phénols sont élevées, plus leurs HEs sont efficaces.

Pinto et al. (2006), ont rapporté que les espèces du genre *Thymus*, qui contiennent une quantité importante en phénols, présentent un large spectre d'activité sur les champignons filamenteux.

El Bouzidi et al. (2013), ont évalué la composition chimique, les activités antioxydantes et antimicrobiennes des HEs de trois espèces de thym endémiques au Maroc. Les résultats obtenus de cette étude appuient la notion selon laquelle le potentiel antimicrobien et

antioxydant des HEs des thyms est conféré par une teneur élevée en thymol et/ ou en carvacrol.

Dans une autre étude, Nikolic et al. (2014), ont évalué l'activité antimicrobienne des HEs de *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut et *Thymus vulgaris* L., Les trois HEs ont montré une activité antimicrobienne significative contre toutes les souches testées avec une prédominance pour l'HE de *Thymus. serpyllum*.

Concernant l'espèce *Thymus fontanesii*, deux travaux ont été réalisés sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de son HE.

Dob et al., (2006), ont évalué l'activité antimicrobienne de l'HE de l'espèce *Thymus fontanesii* en utilisant la méthode de diffusion sur disque ainsi que celle des concentrations minimales inhibitrices. Cette HE a montré une forte activité inhibitrice contre les bactéries à Gram négatif ainsi qu'une activité antifongique maximale contre la souche *Mucor ramaniamus*.

Des travaux similaires ont été réalisés par Bekhechi et al. (2007) sur l'HE de *Thymus fontanesii*. Cette HE a présenté une activité antibactérienne importante contre toutes les bactéries testées excepté *Pseudomonas aeruginosa*.

Aussi, à la lecture de la littérature scientifique, il apparaît que la méthode par micro atmosphère (phase vapeur) et très peu documentée. En effet, rares sont les articles qui traitent de cette méthode. Les études réalisées par Tyagi & Malik. (2010), ont mis en exergue la supériorité de l'action inhibitrice en phase vapeur par rapport à la phase liquide.

Ces quelques travaux cités, illustrent le pouvoir antimicrobien des HEs du genre *Thymus*: propriétés bénéfiques en aromathérapie.

IV.3.4. Les activités biologiques de l'association des Huiles essentielles

Pour se protéger de l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies conduisant à la diminution de l'efficacité de ces médicaments. Face à ce problème de résistance, la recherche des produits, capables, par effet synergique, de contrer les stratégies élaborées par les bactéries, représente une possible solution.

Fu et al. (2007) ont étudié l'activité antimicrobienne des HEs de girofle (*Syzygium aromaticum*) avec celle de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) seules et en combinaison. Les proportions en HEs des combinaisons étudiées étaient de 1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:9 et 3:1, 5:1, 7:1, 9:1 respectivement. Les résultats de cette étude ont indiqué des effets additifs, synergiques et antagonistes.

Kon & Rai. (2012) ont constaté un bon effet de synergie entre les HEs de *Thymus vulgaris* et *Cinnamomum zeylanicum* avec un indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CFI) de 0.26 contre la bactérie *Staphylococcus aureus* et ceci en évaluant l'activité antibactérienne in vitro de l'HE de *Thymus vulgaris* seule et en combinaison avec 34 autres HEs contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*

Aussi, Aguilar-González et al. (2015) ont évalué l'effet synergique entre les HEs de girofle et/ ou de moutarde en phase vapeur in vitro et in vivo contre *Botrytis cinerea* (très nuisible pour les fruits et légumes), ils ont trouvé que l'association présentait un effet antifongique synergique, confirmant que l'utilisation combinée des HEs est plus efficace que leurs applications individuelles.

IV.4. Matériels et méthodes

IV.4.1. Matériel végétal

La récolte des fruits de l'orange douce (*Citrus sinensis*) a été effectuée au mois de Février 2015 dans un terrain agricole de la région de Blida, qui se situe à quelques dizaines de kilomètres au Sud-Ouest d'Alger/Algérie. La partie utilisée pour l'extraction des HEs est l'écorce du fruit.

La menthe poivrée (*Mentha piperita*) a été récoltée au niveau d'une pépinière située à Reghaia (Est d'Alger, Algérie) au mois d'Avril 2016. La partie utilisée pour l'extraction des HEs est la feuille de la plante.

IV.4.2. Matériel biologique

Pour mettre en évidence le pouvoir antimicrobien des HEs, nous avons utilisé 10 souches. Six souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) entretenues par repiquage sur milieu nutritif gélosé, favorable à leur croissance pendant 24 heures à l'obscurité à 37 °C ; *Staphylococcus aureus* (Gram+) ATCC 6538 ; *Bacillus subtilis* (Gram+) ATCC 9372; *Escherichia coli* (Gram-) ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-) ATCC 27853; *Candida albicans* ATCC 24433; *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601.

Quatre souches de diagnostic isolées à l'Institut Pasteur d'Alger : *Salmonella enteritidis*, *Salmonella seftenberg*, *Salmonella kedougou* et *Corynebacterium striatum* (Gram+).

Toutes les souches ont été isolées et identifiées au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Institut Pasteur d'Alger. Ces bactéries et champignons ont été conservés et maintenus en vie, par des repiquages continus, sur des milieux de culture adéquats.

Suivant les méthodes employées et selon les souches illustrées, nous avons utilisé des milieux de culture d'isolement solides, en l'occurrence la gélose nutritive (GN) ou Muller-Hinton (MH) pour les bactéries et la gélose Sabouraud additionné de Chloramphénicol (SAB) et OGA (Oxytétracycline Glucose Agar) pour la culture des souches fongiques.

IV.4.3. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des HEs a été réalisée par hydrodistillation au moyen d'un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928).

La durée de l'extraction a été fixée à trois heures pour l'HE de *Citrus sinensis* et *Mentha piperita* après apparition de la première goutte (Sahraoui, 2011).

IV.4.4. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*

La composition chimique de l'HE de *Citrus sinensis* a été déterminée suivant la même méthode décrite pour la composition chimique de l'HE de *Tymus fontanesii*.

IV.4.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.

1) Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne.

➤ Technique en milieu solide: Méthode de l'aromatogramme

Cette technique est décrite par les auteurs (Benjlali et al., 1986; Satrani et al., 2007; Boukhatem et al., 2014), elle est utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des HEs. Cette technique dérive sur une méthodologie utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélifié.

Cette méthode illustrée par la Figure IV.1, permet de déterminer l'activité inhibitrice par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné d'HE.

100 µl de chaque suspension de microorganisme est étalée sur une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. La surface des boîtes est séchée sous hotte à flux laminaire avec le couvercle des boîtes légèrement ouvert. 4 ml de chaque milieuensemencé est déposé sur la surface de la première couche (couche support) de gélose solidifiée. Des disques stériles de 6 mm de diamètre, imprégnés d'HE (10, 20 et 30 µl), sont déposés au centre de la gélose.

La détermination des diamètres d'inhibition DZI, se fait après 48 heures d'incubation à l'étuve à une température de 25 °C pour les levures et après 24 heures à 37°C pour les bactéries.

La lecture des diamètres est effectuée à l'aide du logiciel de traitement d'images «ImageJ®» (en utilisant la commande *set scale*). La référence des mesures est le disque de 6

mm. Afin de confirmer les résultats de cette méthode, les diamètres d'inhibition ont été déterminés également à l'aide d'un pied à coulisse.

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en mm.

➤ **Technique en micro atmosphère ou méthode en phase vapeur**

Nous avons utilisé cette méthode dans le but d'exploiter les propriétés de la phase volatile des HEs. Cette technique illustrée par la figure IV.2 est rarement citée (Tyagi et Malik, 2010). Le disque imprégné de 10, 20 et 30 μ l est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé.

La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les levures, respectivement. Il se produit une évaporation des substances qui, en contact avec les microorganismesensemencés sur la gélose, va inhiber leur croissance.

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire.

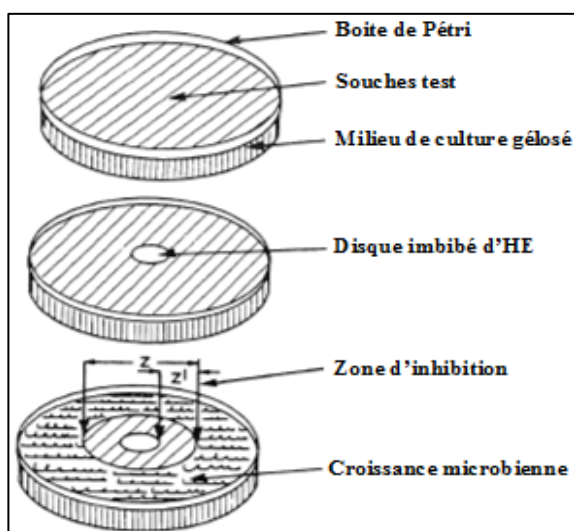


Figure IV.1. Illustration de la méthode de l'aromatogramme (Zaika, 1988).

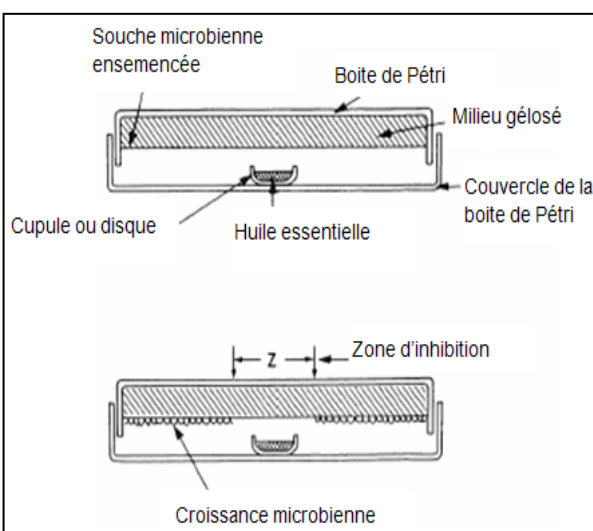


Figure IV.2. Illustration de la méthode de microatmosphère (Zaika, 1988).

En ce qui concerne les étapes de l'expérience, elles sont illustrées en Annexe N°2.

2) Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou Technique des micros dilutions

La force relative d'un antimicrobien est déterminée par ces dilutions en série. Une série de dilutions de l'HE dans le milieu de culture est réalisée pour des concentrations variant de 2 jusqu'à 0,0078%. 1ml de l'extrait émulsionné dans le Tween 80 (V/V) est déposé dans 50ml de milieu Mueller–Hinton (bactéries) et Sabouraud (levures).

La gamme des concentrations finales ainsi obtenue correspond à 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312; 0,0156 et 0,0078 %. La CMI est définie comme étant la plus petite concentration de l'extrait pour laquelle aucune croissance n'est visible.

La méthodologie suivie pour cette technique est illustrée en Annexe N°2.

IV.4.6. Combinaison des huiles essentielles

1) Effets résultants des combinaisons des huiles essentielles

Dans cette étude, on a réalisé deux combinaisons; (HE de thym/ HE d'orange) et (HE de thym/ HE de menthe poivrée). Quatre types d'effets peuvent résulter de cette combinaison:

- **Effet d'indifférence:** l'activité d'une HE n'est pas affectée par l'autre.
- **Effet d'addition:** l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque HE étudiée isolément à la même concentration.
- **Effet de synergie:** l'effet est significativement supérieur à la somme des effets des HEs étudiées isolément à la même concentration.
- **Effet d'antagonisme:** l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des HEs. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque HE prise séparément à la même concentration.

Ces effets sont quantifiés par le calcul de la concentration fractionnelle inhibitrice (CFI).

$$CFI = CFI \text{ de l'agent 1} + CFI \text{ de l'agent 2.}$$

Où les CFI des agents 1 ou 2 se calculent comme suit:

$$CFI \text{ de l'agent 1} = CMI \text{ de la combinaison} / CMI \text{ de l'agent 1.}$$

$$CFI \text{ de l'agent 2} = CMI \text{ de la combinaison} / CMI \text{ de l'agent 2.}$$

Selon Pei et al., (2009), l'évaluation des valeurs des CFI's est comme suit:

CFI <1, effet de synergie

CFI égal à 1, effet d'addition

1 < CFI ≤ 2 cas d'indifférence

CFI >2 cas d'antagonisme.

IV.5. Résultats et discussions

IV.5.1. Détermination des rendements de l'extraction des huiles essentielles

1. Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*

La détermination de l'humidité de l'écorce d'orange douce (*Citrus sinensis*) a révélé un taux d'humidité de 0,85, ce qui signifie que 15%, seulement, représente le taux de la matière sèche ayant servi réellement à l'extraction de l'HE.

Le taux d'humidité obtenu par Sahraoui. (2011) est de 75% et ce pour la même espèce *Citrus sinensis* L. Cette différence est due aux conditions de conservation.

L'écorce de *C. sinensis* a présenté un rendement en HE de $6,52 \pm 0,33\%$. Ce rendement, considérable, est plus élevé que celui obtenu par l'HE de *Thymus fontanesii*.

2. Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de *Mentha piperita*

Le taux d'humidité obtenu à partir des feuilles de la *Menthe poivrée* est égal à 0,81. Nous remarquons que ce taux est élevé et c'est le cas de toutes les menthes même si elles sont sèches. En ce qui concerne le rendement en HE, il est de $2,19 \pm 0,50\%$.

IV.5.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*

Les résultats de l'analyse chromatographique de l'HE de *C. sinensis* par GC/MS ont montré la présence de plusieurs composés avec une forte prédominance des monoterpènes en particulier le limonène; composé majoritaire avec un pourcentage relatif de 79,74 %.

Les monoterpènes oxygénés ont occupés la deuxième place dans la composition de l'HE de *C. sinensis* avec un taux de (6,60 %), ainsi que d'autres composés mineurs comme l'indique le tableau IV.1.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Hellal., 2011; Ferhat., 2006 et El-Akhal et al., 2014, pour la même plante avec des fractions en limonène ayant des pourcentages respectifs de (77,37; 78,50 et 95,36 %).

Tableau IV.1. Composition chimique de l'HE de *Citrus sinensis*

N°	Composé ^a	RI ^b	Pourcentage (%)
Monoterpènes Hydrocarbonés			79,74
1	Limonène	09,59	79,74
Monoterpènes Oxygénés			6,60
2	Linalool	10,90	1,59
3	Limonene Oxide, trans	12,06	0,29
5	Citronella	12,52	0,36
5	Terpinène 4-ol	13,87	0,41
6	L-Linalool	14,34	2,46
7	Neral	15,53	0,47
8	Geranial	16,54	0,65
Sesquiterpène Hydrocarbonés			1,40
9	β-Caryophyllène	21,36	0,19
10	Germacrène D	21,68	0,11
11	Cis-α-Bisabolène	22,42	0,11
12	Valencène	23,67	0,88
13	Delta-Cadinene	24,53	0,11
Sesquiterpène Oxygénés			0,49
14	β- Sinensal	29,50	0,29
15	α-Sinensal	31,00	0,20
Autre composés oxygénés			0,36
16	Dodécanal	20,59	0,36

^a Composés de l'huile essentielle classes selon la famille sur colonne apolaire HP-5MS

^b Indices de retention RI sur colonne non-polar HP5MS™

En ce qui concerne l'HE de la Menthe poivrée, le chromatogramme obtenu pour CPG/FID est représenté par la figure IV.3. En revanche, l'identification par GC/MS n'a pas été réalisée.

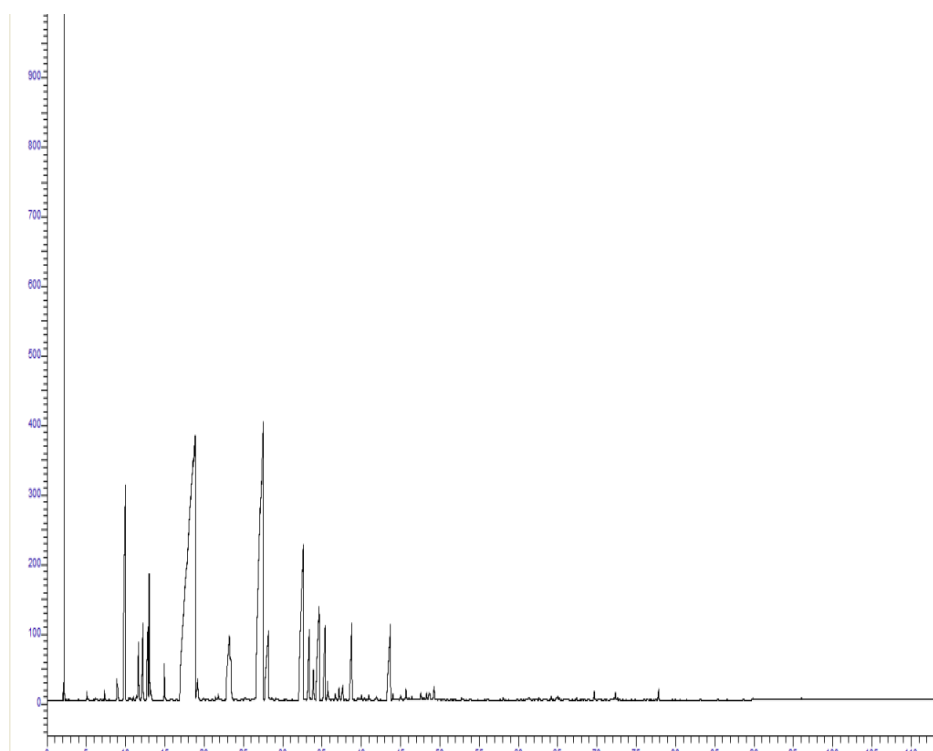


Figure IV.3. Chromatogramme obtenu pour l'HE de la Menthe poivrée.

IV.5.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

1) Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

L'activité antibactérienne et antifongique de l'HE de *Thymus fontanesii* a été réalisée *in vitro* sur des souches microbiennes pathogènes aux humains, animaux et végétaux. Au total, 08 bactéries ont été étudiées (cinq bactéries à Gram + et trois bactéries à Gram-) ainsi que deux levures. Les résultats de cette étude sont rapportés dans le Tableaux IV.2. A noter que le diamètre du disque (6 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

➤ Pour la méthode de l'aromatogramme

Selon les résultats du tableau IV.2, l'HE de thym présente une bonne activité inhibitrice sur la croissance microbienne. Il est à noter que les extraits des plantes sont considérés comme actifs s'ils produisent des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à 15mm.

En phase liquide, l'HE inhibe toutes les souches testées et ceci en dépit de leur morphologie et leur Gram, à l'exception de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* qui se présente avec un DZI de 7 mm pour toutes les doses utilisées, ce qui démontre sa résistance à l'action de l'HE.

Avec des diamètres d'inhibition de 37 à 50 mm pour les disques imprégnés de 10 µl, entre 41 et 60 mm pour les disques imprégnés de 20 µl et entre 47 et 60 mm pour les disques imprégnés de 30 µl d'huile essentielle

Les bactéries Gram⁺ sont plus sensibles à l'action de l'HE que les bactéries Gram⁻. Sur les autres bactéries Gram⁺, les effets sont plus modérés. Nous remarquons des diamètres d'inhibition variant entre 7 et 28 mm pour les disques imprégnés de 10 µl, variant entre 7 et 38 mm pour les disques imprégnés de 20 µl et variant entre 7 et 49 mm pour les disques imprégnés de 30 µl d'HE. Le plus grand diamètre est obtenu pour la souche *Corynebacterium striatum* avec une valeur de 60 mm pour 20 et 30 µl d'HE, respectivement.

Tableau IV.2. Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de *Thymus fontanesii*.

Souches	Aromatogramme			Microatmosphère			CMI (µl/ml)
	Diamètre des zones d'inhibitions ^a . DZI (mm)			Diamètre des zones d'inhibitions ^a . DZI (mm)			
	Volume de l'HE (µl/disc)			Volume de l'HE (µl/disc)			
	10 µl	20 µl	30 µl	10 µl	20 µl	30 µl	
<i>Bactéries Gram-positives</i>							
<i>Staphylococcus aureus</i>	37 ^{Ae}	41 ^{Ab}	56 ^{Bc}	35 ^{Ea}	35 ^{Da}	36 ^{Ea}	0,312
<i>Bacillus subtilis</i>	45 ^{Af}	45 ^{Af}	47 ^{Ab}	25 ^{Ba}	27 ^{Ba}	30 ^{Ba}	0,312
<i>Coryne bacterium striatum</i>	50 ^{Bg}	60 ^{Ac}	60 ^{Ac}	48 ^{Ca}	52 ^{Ea}	52 ^{Ca}	0,078
<i>Bactéries Gram- négatives</i>							
<i>Escherichia.coli</i>	22 ^{Ad}	22 ^{Ae}	22 ^{Af}	22 ^{Aa}	22 ^{Aa}	22 ^{Aa}	0,625
<i>Salmonella enteritidis</i>	28 ^{Aa}	38 ^{Ba}	49 ^{Cb}	22 ^{Aa}	22 ^{Aa}	24 ^{Aa}	0,625
<i>Salmonella seftenberg</i>	27 ^{Ba}	34 ^{Aa}	38 ^{Aa}	21 ^{Aa}	22 ^{Aa}	23 ^{Aa}	0,625
<i>Salmonella kedougou</i>	26 ^{Aa}	34 ^{Ba}	42 ^{Ca}	21 ^{Aa}	22 ^{Aa}	24 ^{Aa}	0,625
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7 ^{Ac}	7 ^{Ad}	7 ^{Ae}	7 ^{Da}	8 ^{Ca}	11 ^{Db}	10
<i>Souches fongiques</i>							
<i>C. albicans</i>	54 ^{Ah}	62 ^{Ac}	68 ^{Bd}	52 ^{Ca}	55 ^{Fa}	58 ^{Cb}	0,156
<i>S.cerevisiea</i>	31 ^{Ab}	33 ^{Aa}	39 ^{Ba}	28 ^{Ba}	28 ^{Ba}	30 ^{Ba}	0,312

DZI : Diamètre de la Zone d'Inhibition en mm; Diamètre du disque (6 mm) a été inclus dans le calcul du DZI;

Les moyennes à l'intérieur d'une même ligne suivie d'une même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes (P< 0.05) selon le test de Tukey Multi-comparaison post-hoc.

Les moyennes dans la même colonne suivie par la même petite lettre ne sont pas significativement différents (P<0.05) selon le test de Tukey post-hoc multi-comparaison.

En ce qui concerne les souches fongiques, pour les levures (*Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*) l'HE a montré une activité antifongique significative. *Candida albicans* semble être l'espèce la plus sensible avec des DZI compris entre 54 et 68 mm.

La figure IV.4, illustre l'action antimicrobienne de l'HE de Thym en aromatoigramme

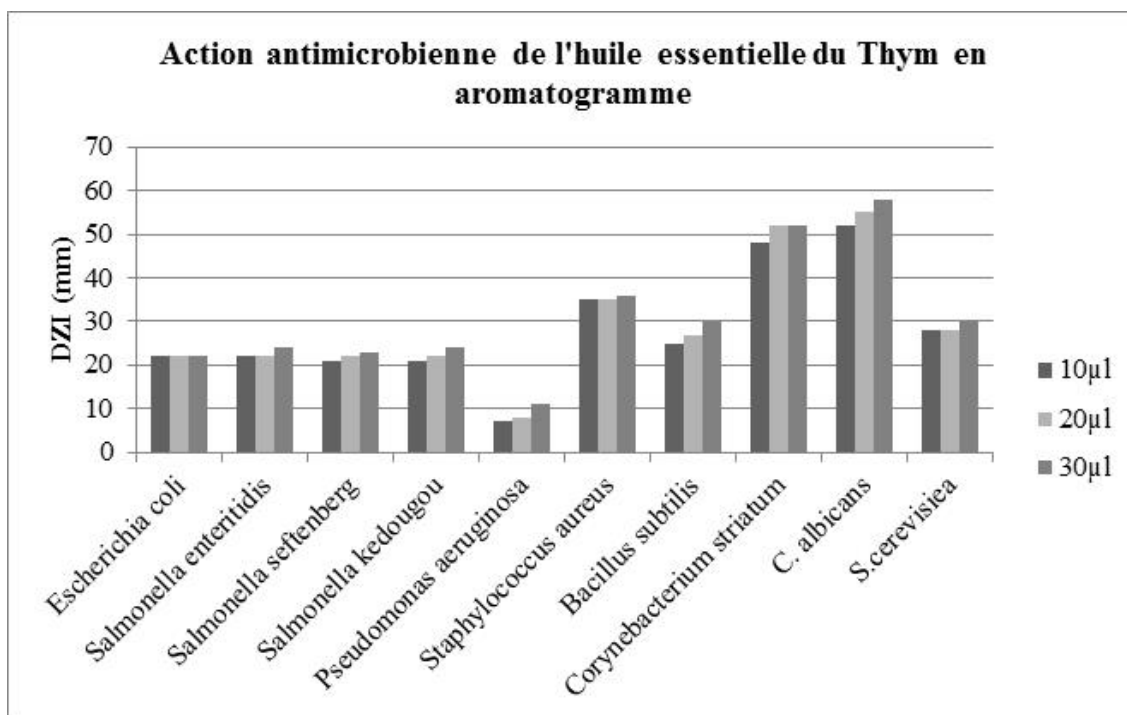


Figure IV.4. Action antimicrobienne de l'HE de *Thymus. fontanesii* en aromatoigramme

Dans le même sillage, nous avons remarqué que l'HE est légèrement plus active contre les bactéries à Gram⁺ par rapport au Gram⁻. Ceci est en accord avec la majorité des travaux antérieurs (Juliano et al., 2000; Smith-Palmer et al., 2001; Gilles et al., 2010).

L'explication de ce phénomène réside dans le fait que les bactéries à Gram⁻ possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne. Cette dernière comprend une membrane externe entourant les parois cellulaires, ce qui limite la diffusion de la composante hydrophobe au moyen de sa couche lipopolysaccharidique (Vaara, 1992)

Chez les bactéries à Gram⁺, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques...). Par contre, chez les bactéries à Gram⁻, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli

d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'elles puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques. La résistance des bactéries à Gram⁻ aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules de franchir la membrane externe (Cummins et Harris, 1956).

L'action antimicrobienne significative de l'HE de *Thymus fontanesii* est liée à sa forte teneur en carvacrol (Ultee et al., 2002).

La position relative du groupe hydroxyle sur le noyau phénolique ne semble pas influencer fortement le degré de l'activité antimicrobienne (Lambert et al., 2001). Le carvacrol a toujours un effet inhibiteur sur différentes souches microbiennes. Parmi elles, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquels il provoque une fuite d'ions potassium et réduit ainsi le gradient de pH à travers la membrane cytoplasmique (Ultee & Smid, 1999).

Cependant, le Carvacrol n'a aucun effet sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Walsh, Maillard et al., 2003). La résistance de cette souche à l'HE testée n'est pas surprenante vu que cette bactérie Gram⁻ a une grande résistance intrinsèque aux biocides liée à la nature de sa membrane externe. De nombreuses études ont confirmé cette théorie (Hammer et al., 1999; Dorman & Deans, 2000).

➤ **Pour la méthode de micro atmosphère (phase vapeur)**

En phase vapeur, l'HE du thym a prouvé son efficacité surtout sur les souches à Gram⁺ avec des diamètres allant de 25 à 52 mm pour les trois doses utilisées. Les souches à Gram⁻ ont également été inhibées, mais à des niveaux plus faibles par rapport aux Gram⁺ (Tableau VI.2).

Avec des diamètres d'inhibition variant entre 7 et 11 mm, la souche *Pseudomonas aeruginosa* a présenté l'activité antimicrobienne la plus faible.

En ce qui concerne les souches fongiques, c'est toujours la levure *Candida albicans* qui est la plus sensible à l'action antifongique en phase vapeur de l'HE du thym avec des DZI de 52, 55, 58 mm, respectivement pour les trois doses testées.

La figure IV.5 illustre l'action antimicrobienne de l'HE de Thym en micro atmosphère (phase vapeur).

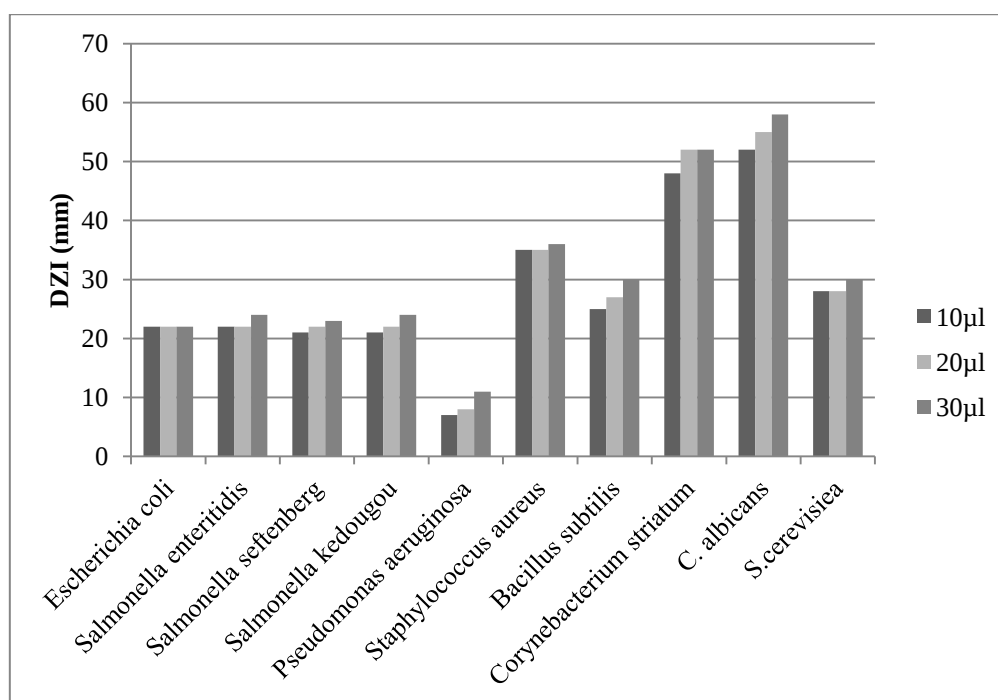


Figure IV.5. Action antimicrobienne de l'HE de *Thymus fontanesii* en micro atmosphère.

En ce qui concerne l'action antifongique (phase vapeur) des HEs en général, et celle du thym en particulier, peu d'études ont été réalisées jusqu'à présent (Tyagi & Malik, 2010; Pibiri, 2006).

La comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes, aromatoigramme et micro atmosphère (Figure IV.6), laisse apparaître une différence importante en termes d'inhibition pour les souches bactériennes. Cependant, l'inhibition en phase liquide semble avoir une certaine efficacité par rapport à l'inhibition en phase vapeur.

Pour la souche bactérienne *Escherichia coli*, les deux techniques semblent donner des résultats similaires avec des DZI de l'ordre de 22mm.

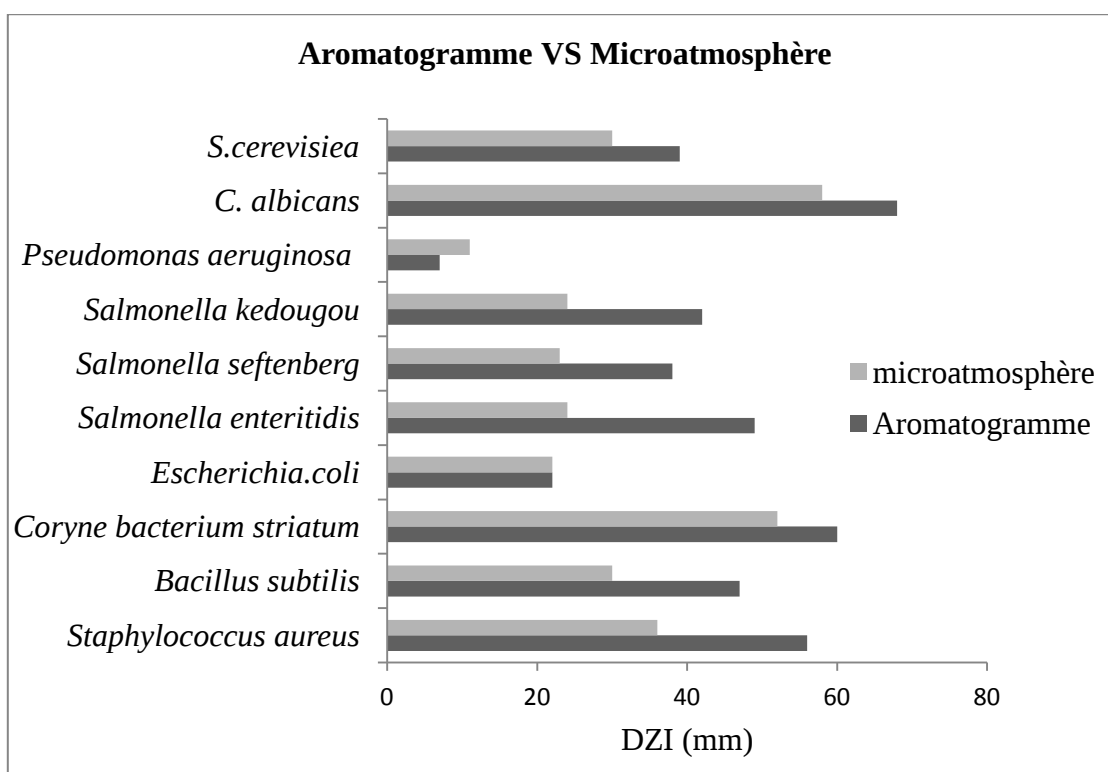


Figure IV.6. Etude comparative entre les méthodes: aromatogramme VS micro atmosphère (volume de l'HE étant de 30 µl/disc)

Selon Bouaoun et al. (2007), la plupart des composés chimiques des HEs sont dotés de propriétés antimicrobiennes dont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes.

Plusieurs auteurs ont attribué l'activité antimicrobienne des *Thymus* au thymol mais dans notre étude l'huile essentielle a pour composé majoritaire le carvacrol. Ce dernier a un effet inhibiteur sur différentes souches.

Le carvacrol a également un large spectre d'activité, étendu à l'adultération des aliments ou des champignons pathogènes, des levures et des microorganismes pathogènes pour les humains, les animaux et les plantes, les biofilms bactériens même ceux résistants aux antibiotiques. Cette activité a été attribuée à ses effets significatifs sur les propriétés structurales et fonctionnelles de la membrane cytoplasmique (Nostro & Papalia., 2012). Les cibles préférées du carvacrol sont les souches *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*.

Les interactions entre les composants de l'HE peuvent également affecter leurs activités. Par exemple, l'efficacité de l'HE du thym contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas*

aeruginosa est due à la synergie entre les principaux composants; le carvacrol et le thymol (Lambert et al., 2001).

Une autre interaction synergique a été mise en évidence parmi le carvacrol et son précurseur, le p-cymène sur *Bacillus cereus*. Le p-cymène devrait faciliter la pénétration intracellulaire du carvacrol, en potentialisant son action (Ultee et al., 2002).

Ces dernières années, la communauté scientifique s'intéresse de plus en plus à l'étude de nouveaux antimicrobiens végétaux. Comme le carvacrol, le thymol, l'eugénol et le cinnamaldehyde employés en aromathérapie, comme molécules phares de la lutte antimicrobienne et leur cible privilégiée, des bactéries aussi variées que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (Dorman et Deans., 2000 et Burt., 2004).

➤ **Concentration minimale inhibitrice (CMI)**

L'activité antimicrobienne de l'HE de *Thymus fontanesii* testée contre les microorganismes a été évaluée également quantitativement par la détermination des CMI.

Les résultats donnés dans le (tableau IV.2) indiquent que cette HE présente des activités antibactériennes à des degrés variables contre des microorganismes, avec des valeurs des CMI variant de 0,078 à 0,625 µl/ ml

Excepté pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* (CMI=10), toutes les autres souches sont inhibées par l'HE à des concentrations inférieures ou égales à 0,625 µL / ml.

Cette HE a montré une activité antibactérienne élevée contre les bactéries Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Corynebacterium striatum*) avec une CMI de 0,312, 0,312 et 0,078, respectivement. Avec une valeur de CMI de 0,078, *Corynebacterium striatum* était le germe testé le plus sensible.

Les bactéries Gram- (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella seftenberg*, *Salmonella kedougou*) étaient moins sensibles et présentaient des valeurs de CMI égales à 0,625 µL/ ml.

De même, l'HE a présenté une forte activité contre les deux levures (*C. albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*) (0,156 et 0,312 µl/ ml, respectivement).

La résistance aux *Pseudomonas* n'est pas surprenante. Elle est due à la nature de la membrane externe qui confère une résistance à la plupart des biocides. (Bouhdid et al., 2006).

Des résultats similaires ont été mis en évidence par Adwan et al. (2006), Rasooli & Mirmostafa, (2002) et Al-Bayati, (2008).

Staphylococcus aureus, se révèle très sensible. Cette sensibilité accrue est confirmée par les résultats d'Oussalah et al. (2006).

En comparant ces données avec ceux de l'aromatogramme et de la micro atmosphère, on constate que la méthode quantitative des CMI confirme les résultats des deux méthodes étudiées.

2) Activité antimicrobienne de la combinaison des huiles essentielles

Dans cette partie, nous avons évalué l'activité antimicrobienne de deux combinaisons comprenant l'HE Thym dans celle de l'Orange douce ainsi que l'HE Thym dans celle de la Menthe poivrée.

Deux souches ont été testées pour l'association HE Thym/ HE Orange douce et quatre souches pour l'association HE Thym/ HE Menthe. Il s'agit de *Candida. albicans* et *Pseudomonas aeruginosa* pour la première combinaison et de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Candida. albicans* pour la seconde.

L'activité antimicrobienne de ces combinaisons a été effectuée par la méthode de diffusion sur gélose ainsi que par la méthode des CMI's à une proportion de 40µl de l'HE de thym dans 500 µl d'orange pour la première et à 100µl de l'HE de thym dans 500 µl d'HE Menthe pour la seconde.

Les diamètres des zones d'inhibition (DZI) de l'HE de l'écorce de *C. sinensis seule* et en combinaison avec l'HE de *T. fontanesii* sont regroupés dans le tableau 1 donné en ANNEXE N°3.

De même, les diamètres des zones d'inhibition (DZI) de l'HE de *M. piperita* seule et en combinaison avec l'HE de *T. fontanesii* sont illustrés dans le tableau 2 donné en ANNEXE N°3.

Les résultats de l'étude quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de l'écorce de *C. sinensis seule* et en combinaison avec l'HE de *T. fontanesii* sont illustrés par le tableau IV.3.

D'après le tableau IV.3, on remarque que l'HE de *C. sinensis* est inefficace contre *Ps. aeruginosa* et *C. albicans*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Hellal. (2011) qui a étudié l'activité antimicrobienne de l'HE de *C. sinensis* sur *Ps. aeruginosa*. Ainsi les résultats de Trabelsi et al. (2014) ont montré que l'HE de *Citrus aurantium* et non inhibitrice sur *Ps. aeruginosa* et *C. albicans*, ce qui confirme nos résultats.

Tableau IV.3. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de l'écorce de *C. sinensis* seule et en combinaison avec l'HE de *T. fontanesii*.

Souche	CMI (µl/ml)		
	HE <i>C. sinensis</i>	Combinaison	HE <i>T. Fontanesii</i>
	HE <i>T. fontanesii</i> / HE <i>M. piperita</i>		
<i>C. albicans</i>	20	0,156	0,156
<i>Ps. aeruginosa</i>	20	20	20

Même si l'HE de *C. sinensis* seule est inefficace contre *C. albicans*, en s'associant avec l'HE de *T. fontanesii*, elle marque une efficacité intéressante et pratiquement identique à celle de l'HE de *T. fontanesii*.

Ce résultat s'avère donc intéressant du fait que la valeur de la CMI reste la même pour la combinaison nonobstant le fait que l'HE de *T. fontanesii* a été diluée 12 fois dans celle de *C. sinensis*.

En revanche, pour ce qui concerne la souche *Ps. Aeruginosa*, on remarque une résistance persistante à la combinaison.

De même, les résultats de l'étude quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de *M. piperita* seule et en combinaison avec l'HE de *T. fontanesii* sont illustrés par le tableau IV.4.

Tableau IV.4. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de *M. piperita* seule et en combinaison avec l'HE de *T. fontanesii*.

Souche	CMI (µl/ml)		
	HE <i>M. piperita</i>	Combinaison	HE <i>T. Fontanesii</i>
	HE <i>T. fontanesii</i> / HE <i>M. piperita</i>		
<i>C. albicans</i>	10	0,312	0,156
<i>E. coli</i>	10	0,625	0,625
<i>B. subtilis</i>	10	0,625	0,312
<i>S. aureus</i>	10	0,312	0,312

En ce qu'il s'agit de l'HE de *M. piperita*, elle ne présente aucune activité vis-à-vis des quatre souches étudiées avec des CMI de 10 µl/ml.

L'HE de *M. piperita* est inefficace contre *E. coli* et *S. aureus*. Néanmoins en s'associant avec l'HE de *T. fontanesii*, elle marque une efficacité intéressante et identique à celle de l'HE de *T. fontanesii*.

Ce résultat s'avère intéressant du fait que la valeur de la CMI reste la même pour la combinaison bien que l'HE de *T. fontanesii* a été diluée 5 fois dans celle de *M. piperita*.

Même si l'HE de *M. piperita* est inefficace contre *C. albicans* et *B. subtilis*, en s'associant avec l'HE de *T. fontanesii*, elle marque une efficacité intéressante.

La combinaison HE thym/ HE menthe engendre une grande sensibilité envers les souches *S. aureus* et *C. albicans* (CMI qui était de 10 passe à 0.312 µg/ml) suivie respectivement par *B. subtilis* et *E. coli* (CMI qui était de 10 passe à 0.625 µg/ml). Avec ces combinaisons, les volumes d'HE de *T. fontanesii* nécessaires à l'inhibition des souches sont nettement réduits.

D'après les résultats de l'étude quantitative, pour toutes les souches étudiées, les CMI correspondantes aux deux combinaisons sont importantes comparativement à celles obtenues pour les HEs de *C. sinesis* et *M. piperita* utilisées seules.

Rappelons que la concentration fractionnelle inhibitrice (CFI) de l'association des HEs est égale à la somme des CFI des deux HEs et que la CFI de chacune des deux HE est équivalente au rapport de la CMI de la combinaison à la CMI de l'HE seule.

Le tableau IV.5 résume les valeurs des CFI pour la combinaison HE thym/ HE orange.

Tableau IV.5. Résultats de la combinaison entre les HEs de *T. fontanesii* et de *C. sinesis*

Souche	CMI combinée/ CMI de l'HE de <i>T. fontanesii</i>	CFI de l'HE de <i>T. fontanesii</i>	CMI combinée/ CMI de l'HE de <i>C. sinesis</i>	CFI de l'HE de <i>C. sinesis</i>	CFI de l'association
<i>C. albicans</i>	0,156/0,156	1 (effet d'addition)	0,156/20	0,0078 (effet de synergie)	2 (effet d'indifférence)
<i>Ps. Aeruginosa</i>	20/20	1 (effet d'addition)	20/20	1 (effet d'addition)	2 (effet d'indifférence)

Ainsi, le tableau IV.6, résume les résultats obtenus de l'association HE thym/ HE menthe.

Tableau IV.6. Résultats de la combinaison entre les HEs de *T. fontanesii* et de *M. piperita*

Souche	CMI combinée/ CMI de l'HE de <i>T. fontanesii</i>	CFI de l'HE de <i>T. fontanesii</i>	CMI combinée/ CMI de l'HE de <i>M. piperita</i>	CFI de l'HE de <i>M. piperita</i>	CFI de l'association
<i>C. albicans</i>	0,312/0,156	2 (effet d'indifférence)	0,312/10	0,031 (effet de synergie)	2,031 (effet d'antagonisme)
<i>E. coli</i>	0,625/0,625	1 (effet d'addition)	0,625/10	0,062 (effet de synergie)	1,062 (effet d'indifférence)
<i>B. subtilis</i>	0,625/0,312	2 (effet d'indifférence)	0,625/10	0,062 (effet de synergie)	2,062 (effet d'antagonisme)
<i>S. aureus</i>	0,312/0,312	1 (effet d'addition)	0,312/10	0,031 (effet de synergie)	1,031 (effet d'indifférence)

D'après ces résultats, on constate que la CFI de l'HE de *C. sinensis* présente un effet de synergie. Cependant, la CFI de l'HE de *M. piperita* se traduit soit par une interaction positive (synergie) ou par un effet d'addition.

L'HE de *T. fontanesii* riche en molécules bioactives, a permis une meilleure inhibition des deux autres HEs utilisées en combinaison.

Par contre, les CFIs de l'association HE de Thym/ HE de *C. sinensis* présentent un effet d'indifférence concernant les souches testées tandis que les CFIs de l'association HE de Thym/ HE de *M. piperita* présentent soit un effet d'indifférence ou d'antagonisme. On remarque donc une variation de l'interaction observée entre les combinaisons et les souches.

L'efficacité des associations semble être liée à la composition chimique des HEs combinées et aux interactions possibles entre leurs principales composantes. Goñi et al. (2009) ont souligné que le menthol a la plus faible capacité antibactérienne. Des résultats similaires ont été rapportés pour l'eugénol et le menthol par Pei et al. (2009).

Bassolé et al. (2010), ont étudié l'interaction (synergie, antagonisme, indifférence ou addition) entre deux composés Carvacrol/ Menthol contre *Ps. Aeruginosa* et ont trouvé une CFI égal à 2,07. Cette dernière se traduit par un effet d'antagonisme.

IV.6. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons entrepris une étude sur le pouvoir antimicrobien de quelques combinaisons d'HEs.

L'HE de *T. fontanesii* même diluée dans celle de *Citrus sinensis* et dans celle de *Mentha piperita*, a gardé ses pouvoirs antimicrobiens.

Les agrumes occupent une place de premier plan dans la production des fruits. Leurs déchets riches en matières odorantes donnent naissance aux HEs. A titre d'exemple, l'HE des écorces de l'orange douce génère un rendement de 6%. Cette HE, riche en monoterpenes, peut être utilisée dans les formulations pharmaceutiques. Elle peut être utilisée comme solvant pour d'autres molécules bioactives tels que l'HE de *T. fontanesii*.

Chapitre V.

**Formulation d'une
crème pharmaceutique**

V.1. Objectif du chapitre

Dans ce chapitre, nous allons proposer une formulation pharmaceutique. Trois variantes de crème à effet cicatrisant seront réalisées. La première à base de l'HE de *Thymus. fontanesii*, la deuxième à base du gel d'*Aloe arborescens* et la troisième avec la combinaison HE de *Thymus. fontanesii* et du gel de l'*Aloe arborescens*.

Les activités cicatrisantes de ces formulations seront évaluées individuellement et comparées à celle de l'association des deux extraits.

L'optimisation de l'homogénéité de l'association HE/ gel, sera illustrée par l'évaluation du degré de miscibilité en utilisant le logiciel d'analyse d'images «ImageJ®».

V.2. Introduction

L'activité cicatrisante des plantes est reconnue dans toutes les civilisations. Cette partie de la médecine traditionnelle a fait l'objet de nombreuses études scientifiques. Grâce aux résultats des différentes recherches, les vertus et les mécanismes d'action des molécules bio actives de ces plantes sont aujourd'hui reconnues scientifiquement et adoptés par la médecine contemporaine ainsi que par l'industrie cosmétique.

Plusieurs médicaments pour stimuler le processus de cicatrisation sont produits à base de plantes. Habbu et al. (2007) dans une étude présentant une revue bibliographique détaillée sur les cicatrisants naturels, ont axé leurs recherches sur les différents phyto constituants responsables de l'activité cicatrisante. Ces auteurs ont décrit 81 plantes étudiées par différents auteurs.

Parmi ces plantes à effet cicatrisant, le thym dont l'HE a montré une bonne activité cicatrisante vis-à-vis de la muqueuse gastrique. Cette activité a été largement commentée et argumentée au niveau du chapitre III. Ceci nous a amené à proposer une formulation d'une crème à effet cicatrisant qui sera testée sur des plaies d'incisions réalisées sur des rats.

V.3. Généralités sur les émulsions

Une émulsion est la dispersion d'un liquide en fines gouttelettes dans un autre liquide. Ces deux liquides doivent être non miscibles et avoir des solubilités différentes. Le liquide sous forme de gouttelettes est appelé phase dispersée (ou discontinue), tandis que l'autre liquide est appelé phase dispersante (ou continue). Un agent appelé tensioactif (ou surfactant) assure la stabilité du mélange.

Les émulsions sont composées d'une phase aqueuse (eau, vinaigre, etc.) et d'une phase huileuse (huile d'olive, de soja, etc.). Une émulsion huile dans eau (H/E), représentée à la Figure V.1 a), est composée d'une phase huileuse dispersée dans une phase aqueuse. Au

contraire, la Figure V.1 b) schématise une émulsion eau dans l'huile (E/H). Une émulsion E/H est plus grasse au toucher, car ce sens correspond majoritairement à la nature de la phase externe. On peut également trouver des émulsions multiples H/E/H ou E/H/E, comme illustré par la Figure V.1 c).

Les émulsions sont considérées comme étant des systèmes dispersés (Brochette, 1999).

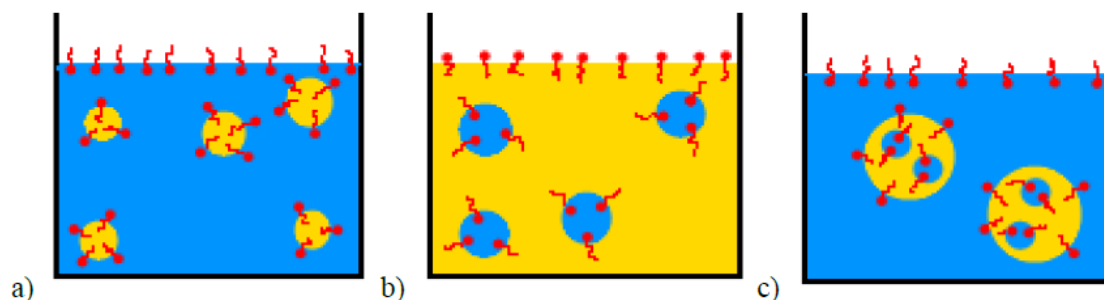


Figure V.1. Les différents types classiques d'émulsion: a) émulsion huile dans eau (H/E); b) émulsion eau dans huile E/H; c) émulsion double eau dans huile dans eau E/H/E. Le tensioactif est représenté en rouge.

V.4. Travaux Antérieurs

V.4.1. Travaux antérieurs relatifs à l'*Aloe arborescens*

L'*Aloe arborescens* est une plante originaire de l'Afrique australe et de certaines îles de l'océan Indien (Bastian et al., 2013 ; Iserine, 2001 ; Reynolds, 2004). C'est une espèce endémique de la péninsule de cap. Elle a été importée par de nombreux pays tropicaux et subtropicaux pour ses qualités ornementales et ses vertus médicinales. Selon Baba Aissa (2011), les aloès sont peu fréquents en Algérie. Elles sont surtout cultivés, ou alors subspontanés sur le littoral où ils sont d'ailleurs confondus avec l'Agave.

➤ Composition chimique

La composition chimique des aloès est très compliquée. Des études ont montré que les aloès contiennent plus de 160 composés chimiques, parmi lesquels 72 sont fonctionnels, comme les anthraquinones, les polysaccharides, les enzymes, les acides aminés, et l'eau qui constitue 96% du poids entier de la feuille (Li, 2009).

Les constituants chimiques des feuilles de l'*Aloe arborescens* ont été étudiés par plusieurs chercheurs et ses constituants phénoliques sont considérés d'une grande importance (Kulkarni et al., 2013). Cette espèce est très riche en principes actifs. Elle est considérée comme la plus riche en ces composés par rapport aux autres aloès car elle contient environ cent principes actifs.

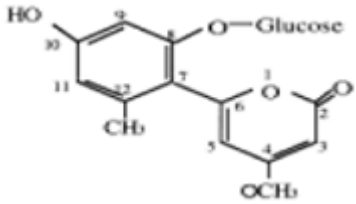
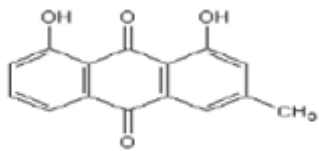
Bassetti et Sala. (2005), ont divisé les différents composés des aloès en trois grands groupes; les glucides, les anthraquinones et les constituants nutritifs.

D'après les travaux de Li. (2009), les glucides se répartissent généralement dans le gel et se divisent en deux catégories; monosaccharides (glucose, mannose, galactose, xylose et le fructose) et polysaccharides (cellulose, la pectine, la gomme arabe, l'acemannane et les aloemannes).

Le Tableau V.1 regroupe la structure chimique de quelques anthraquinones.

Tableau V.1. Structure chimique de quelques anthraquinones (Reynolds, 2004).

Anthraquinone	Structure chimique
Aloïne A	
Aloïne B	
Aloesine	
Aloe-emodine	
Acide salicylique	

Aloénine	
Acide chrysophanique	

Selon Reynolds. (2004), d'autres composés phénoliques ont été isolés à partir des feuilles d'*Aloe arborescens*, les flavonoïdes sont très largement distribués au niveau de la peau des feuilles

Concernant les constituants nutritifs, il s'agit des minéraux, des vitamines, des acides aminés, des protéines et des lipides.

Selon Reynolds. (2004), le magnésium, le calcium et le manganèse ne constituent que 2.1 et 9% respectivement de toute la fraction minérale du gel, alors que le potassium et le sodium constituent 57 et 32% de la fraction minérale du gel d'*Aloe arborescens* respectivement.

Bassetti et Sala. (2005); Reynolds & Dweck. (1999) et Reynolds. (2004) ont montré que les aloès contiennent de nombreuses vitamines, qui sont essentielles pour l'entretien de la cellule, la croissance et l'intégrité cellulaire. L'*Aloe arborescens* s'est avérée riche en vitamines A, C et E, qui sont des antioxydants, et interviennent dans la réduction de l'inflammation dans les blessures. Aussi, elle est riche également en d'autres vitamines de groupe B telle que: B1, B2, B3, B6, B9 et B12.

➤ **Activité cicatrisante**

Les études portant sur l'activité cicatrisante des aloès sont nombreuses. Chitra et al. (1998a), ont indiqué que le traitement par l'*Aloe vera* des plaies créées chez des rats diabétiques peut améliorer le processus de guérison des blessures en influençant des phases telles que l'inflammation, la synthèse de collagène et la contraction de la plaie. Ces auteurs ont expliqué que ces effets peuvent être dus aux effets hypoglycémiant attribués au gel de l'Aloe.

Dans une autre étude, ces mêmes auteurs ont évalué l'influence de l'*Aloe vera* sur les composants du glycosaminoglycane et ils ont rapporté que l'*Aloe vera* a une influence positive sur la synthèse de glycosaminoglycane (Chitra et al., 1998b).

V.4.2. Travaux antérieurs relatifs à l'activité cicatrisante de l'huile essentielle de thym

Dursun et al. (2003) ont testé le rôle protecteur de l'HE de thym sur des lésions en surveillant la production de l'oxyde nitrique. Ce dernier est un médiateur important dans de nombreux événements physiologiques et pathophysiologiques. Les résultats de cette étude ont indiqué que l'HE des *Thymus* peut servir d'agent protecteur aux tissus endommagés en diminuant le niveau de l'oxyde nitrique. Les résultats des examens histologiques ont montré que la formation des nouveaux tissus chez les rats recevant l'HE de thym était plus importante que celle des autres groupes testés.

V.5. Matériels et méthodes

V.5.1 Matériel végétal

L'*Aloe arborescens* a été récoltée et identifiée au niveau de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (l'ENSA) au mois d'Avril 2015 (figure V.2). Les feuilles de cette plante ont été choisies aléatoirement, elles répondent aux critères suivants: feuilles saines, fraîches, de hauteur d'environ 30 cm et de couleur vert foncé.



Figure V.2. Photographie de l'*Aloe arborescens* (image originale).

V.5.2. Médicament

Le Madécassol® utilisée comme référence est un produit commercial. Il a été obtenu au niveau d'une pharmacie «Madécassol®», il est constitué de:

- Hydrocotyle 1 g (*Centella asiatica*; reconstitué titré asiaticoside, extrait sec contenant 40% de l'acide madécassique et de l'acide asiatique 60%).
- Autres ingrédients (99g): L'éthylène glycol (mono+diester), palmito-stéarate, propylène glycol, paraffine liquide, HE de lavande, HE de géranium et de l'eau purifiée.

V.5.3. Extraction du gel d'*Aloe arborescens*

Les feuilles d'*Aloe arborescens* sont lavées avec l'eau distillée et séchées. Les épines sont éliminées à l'aide d'un couteau. Le latex est extrait en coupant la base des feuilles et en le laissant s'écouler verticalement pendant environ 60 minutes. Ensuite, les feuilles sont coupées en deux, afin de collecter le gel à l'aide d'une cuillère dans un flacon fumé et sec et le conserver au réfrigérateur (figure V.3).

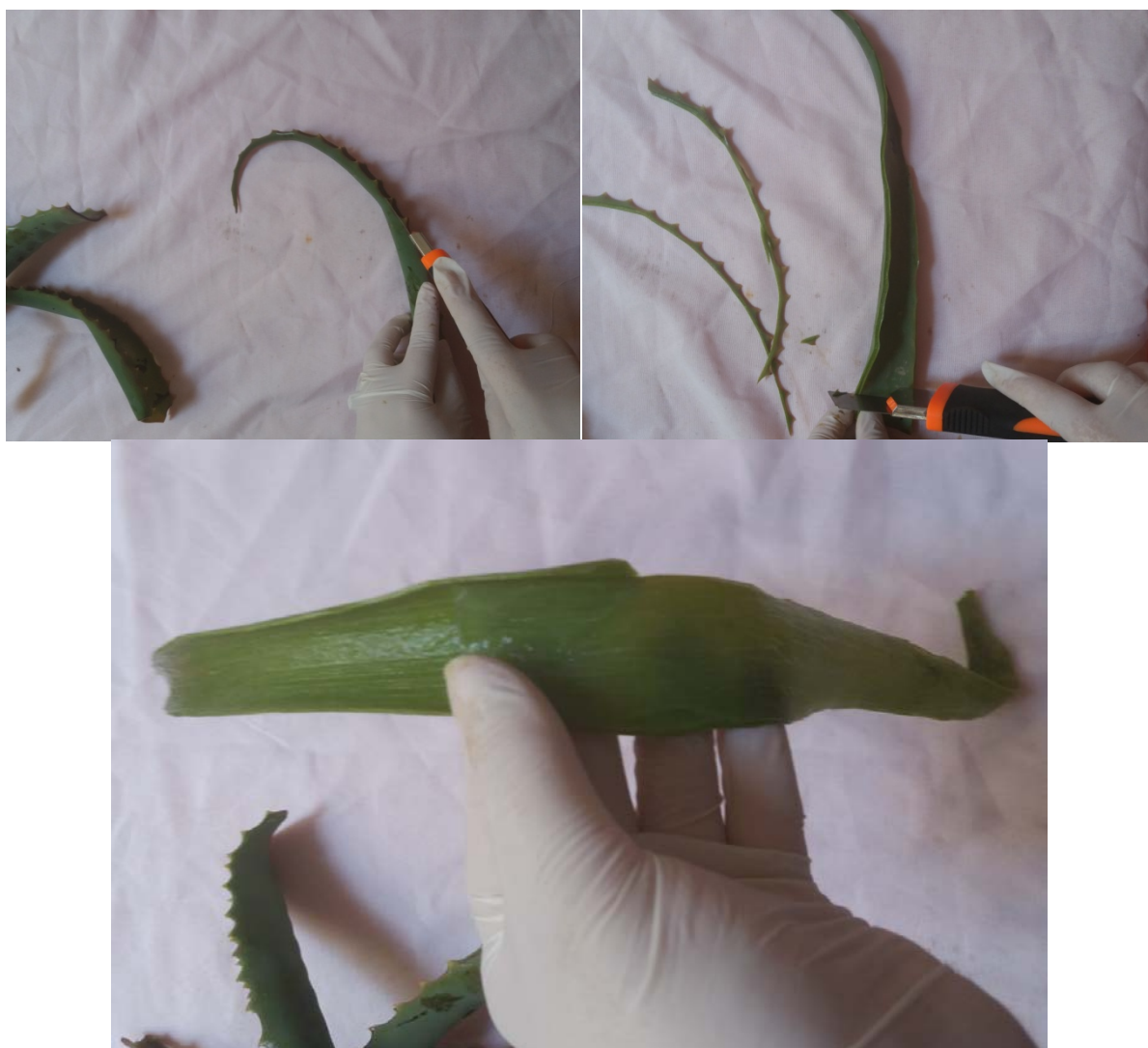


Figure V.3. Les différentes étapes de l'extraction du gel de l'*Aloe arborescens* (image originale).

Afin de garder sa composition la plus intacte possible, le gel collecté doit être utilisé dans les 24 heures qui suivent sa préparation (Femenia et al., 1999 ; Krokida et al., 2011 ; Reyes et al., 2012).

V.5.4. Paramètres morphologiques des feuilles d'*Aloe arborescens*

Les paramètres morphologiques des feuilles de l'*Aloe arborescens* ont été déterminés selon la méthode de Zapata et ses collaborateurs (2013), soit: Poids des feuilles (g); Longueur et épaisseur des feuilles (cm); Largeur à la base et au milieu de la feuille (cm); Rendement du gel par gramme des feuilles entières (%).

V.5.5. Dosage des composés phénoliques totaux du gel d'*Aloe arborescens*

Le dosage des composés phénoliques totaux est déterminé selon la méthode décrite par Kim et al. (2003). C'est une méthode colorimétrique, utilisant le Follin-ciocalteu comme réactif et l'acide gallique comme standard d'étalonnage.

Un volume de 0,5 ml d'extrait est ajouté à 0,5 ml du réactif Folin-ciocalteu, après 3 minutes, 2mL de carbonates de sodium (200 mg/ml) sont ajoutés. L'ensemble est mélangé, puis les tubes sont maintenus à température ambiante et à l'obscurité pendant 15 minutes, ensuite 10 mL d'eau distillée sont ajoutées.

La lecture est faite par spectrophotométrie à 760 nm, la concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard (ANNEXE N°4). Les concentrations sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par 100g du poids frais (mg Eq AG/100g du PF).

V.5.6. Evaluation de la miscibilité de l'HE de *T. fontanesii* dans le gel d'*Aloe arborescens*

Afin d'optimiser l'homogénéité de l'association HE/gel, le degré de miscibilité a été évalué. L'HE ainsi que le gel ont été mélangées à différentes proportions (1/20, 5/20, 7.5/20 %, v/v), respectivement dans des tubes à essais. Quelques gouttes de chaque solution sont prélevées et déposées entre lames et lamelles. Les lames chargées sont observées au microscope et photographiées lorsque l'image est stable. Les photographies seront analysées à l'aide du logiciel ImageJ®.

Le degré de miscibilité est calculé comme suit;

➤ Détermination du taux de miscibilité

Le volume total de la gouttelette déposée est donné par l'équation (V.1)

$$V_{Tot} = V_{sol} + V_{nsol} = L \cdot H \cdot e \quad (V.1)$$

Avec:

V_{Tot} : Volume total de l'image, V_{sol} : volume de la portion soluble, V_{nsol} : volume de la portion non soluble ((volume des gouttelettes), L : Longueur de l'image, H : Hauteur de l'image, e : Epaisseur de l'image.

Le volume de la fraction non soluble est donné par l'équation (V.2)

$$V_{nsol} = \{S_1 + S_2 + S_3 + \dots + S_n\} \cdot e = \{\sum S_i\} \cdot e \quad (V.2)$$

S_i et N_i représente la surface des gouttelettes et le nombre de pixels respectivement, sachant que:

$$S_i = N_i \cdot l \cdot h \quad (V.3)$$

On pose $l = h = 1$. L'équation devient comme donnée par l'équation V.4:

$$V_{nsol} = \{\sum N_i\} \cdot e \quad (V.4)$$

On définit alors, le taux de miscibilité par M suivant l'équation V.5

$$M = \frac{V_{Tot} - V_{nsol}}{V_{Tot}} = 1 - \frac{e \cdot \sum N_i}{L \cdot H \cdot e} = 1 - \frac{\sum N_i}{L \cdot H} \quad (V.5)$$

* L'épaisseur se simplifie, nous passons d'un volume en (3D) à une surface en (2D).

D'après ces équations, le taux de miscibilité « M » est définie comme par l'équation V.6

$$M = 1 - \frac{\text{La surface totale des gouttelette (non solubles)}}{\text{la surface de l'image}} \quad (V.6)$$

Donc $M=1$ —fraction surfacique

M : représente la miscibilité de l'HE dans le gel, plus le nombre des gouttelettes est faible, plus la miscibilité augmente d'où une plus grande homogénéité du mélange.

V.5.7. Préparation des émulsions

Dans cette partie, on a préparé des émulsions H/E en ajoutant une phase huileuse, constituée de propylèneglycol à 18% et de l'alcool cétostyrlique à 9% à une solution aqueuse formée d'eau (en qsp) et de 2% de polysorbate 60, sous agitation continue.

Cette émulsion constitue l'émulsion de base.

A cette dernière, a été additionné d'une part et séparément l'HE de *Thymus fontanesii* ainsi que le gel d'*Aloe arborescence* respectivement à 0,1 et 2% et d'autre part en combinant les deux extraits aux mêmes valeurs (HE à 0,1% et gel d'*Aloe arborescence* à 2%).

Les proportions 0,1 et 2% de l'HE de *Thymus fontanesii* ainsi que le gel d'*Aloe arborescence* ont été choisis suite à la détermination du degré de miscibilité optimal (1/20).

Le tableau V.2 illustre les quantités des constituants retenus pour la formulation des émulsions. Les quantités en eau purifiée sont de 70,7g pour l'émulsion contenant l'HE de *Thymus fontanesii* seule, 68,8g pour l'émulsion contenant le gel de l'*Aloe arborescence* seul et 68,7g pour l'émulsion contenant la combinaison HE/ gel.

Aucun antioxydant n'a été ajouté vu que l'HE de thym a montré un potentiel antioxydant capable, à lui seul, de protéger ces préparations dans les conditions d'étude.

Tableau V.2. Quantités des constituants utilisés dans la préparation des trois émulsions.

	Fonction	Référence bibliographique	Quantité pour une préparation de 100 g
Polysorbate 60	Solubilisant	Pharmacopée Européenne 2011 7 ^{ème} édition	2 g
Propylène glycol	Solvant/véhicule huileux	Pharmacopée Européenne 2011 7 ^{ème} édition	15 g
Glycérol	Anti bactérien	Pharmacopée Européenne 2011 7 ^{ème} édition	3 g
Alcool cétostéarylique	Consistance	Pharmacopée Européenne 2011 7 ^{ème} édition	9 g
Laurylsulfate de sodium	Emulsifiant	Pharmacopée Européenne 2011 7 ^{ème} édition	0.2
HE de thym	utilisée comme principe actif	chapitre I Paragraphe 4.5	0.1 g
Gel d'Aloe arborescence	utilisé comme principe actif	Chapitre V Paragraphe 5.1	2 g
Eau purifiée	Solvant/ véhicule aqueux	Pharmacopée Européenne 2011 7 ^{ème} édition	70,7; 68,8; 68,7g

Le diagramme de fabrication des émulsions est illustré par la figure V.4.

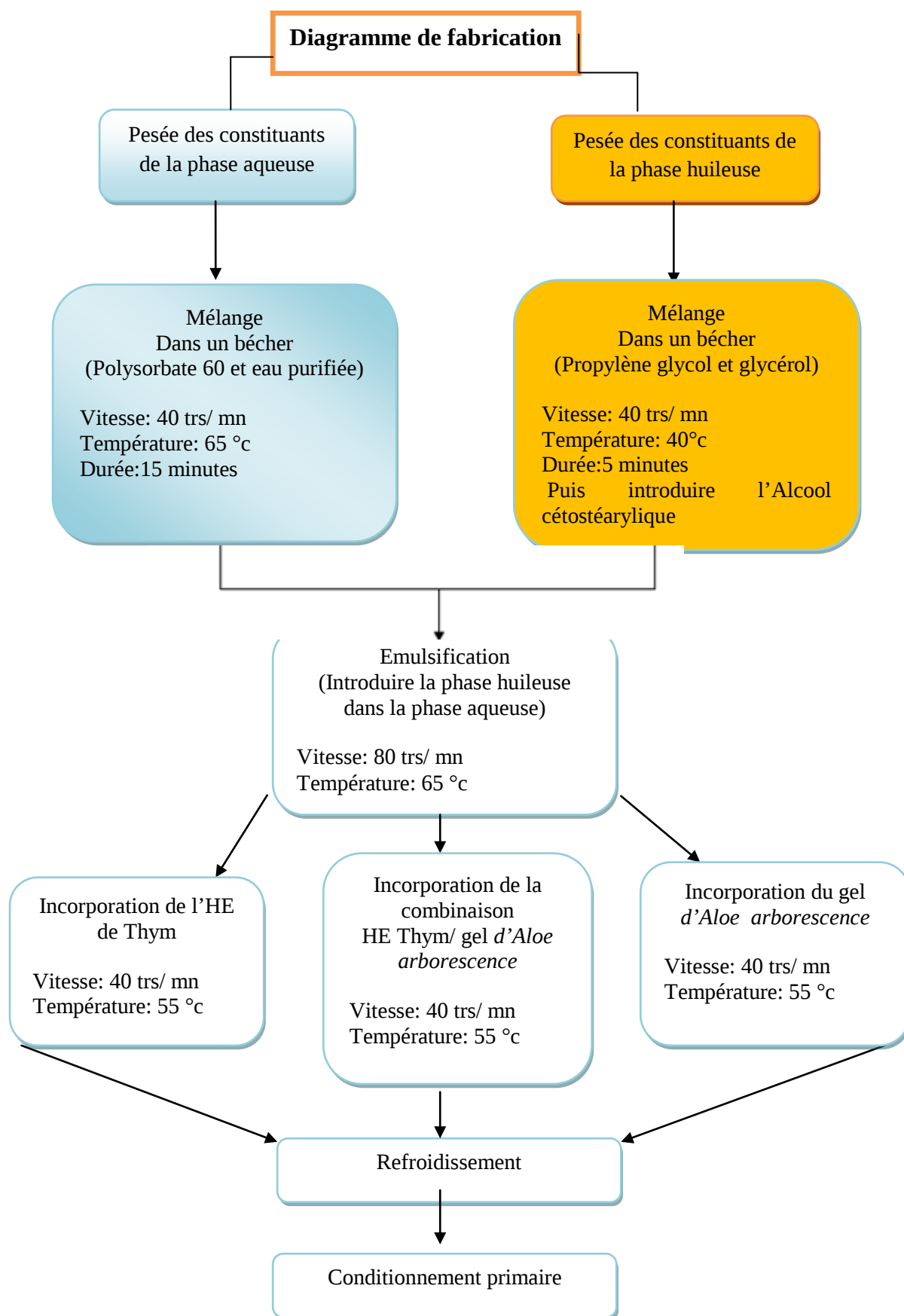


Figure V.4. Diagramme de l'élaboration des émulsions

V.5.8. Contrôle des caractéristiques macroscopiques et microscopiques

L'examen des caractéristiques macroscopiques constitue la première approche de la qualité des préparations.

Des contrôles comprenant les propriétés organoleptiques (couleur et odeur), l'homogénéité macroscopique, le pH ainsi que la consistance ont été effectués.

La granulométrie, qui est l'étude de la taille des gouttelettes de la phase dispersée, permet de déterminer les différentes tailles des gouttelettes ainsi que leur diamètre moyen. Il existe différentes méthodes pour mesurer la granulométrie d'une émulsion. La méthode la plus simple est l'utilisation d'un microscope optique. Elle consiste à prendre une photographie représentative de l'ensemble des gouttelettes de l'émulsion à partir d'un microscope et d'analyser l'image obtenue à l'aide d'un logiciel de traitement d'images. On obtient ainsi une description géométrique de l'ensemble des gouttelettes présentes dans l'émulsion.

Dans notre cas, nous avons utilisé un microscope optique «OPTICA, italy» relié à une caméra numérique. Le traitement des résultats est réalisé par le logiciel ImageJ®.

Les coefficients de variation de la répartition de la taille des émulsions préparées ont été déterminés à partir des photographies de gouttelettes prises au microscope décrit précédemment. Le Coefficient de Variation (CV, %) est défini comme le rapport de l'écart-type (σ) à la moyenne (μ) selon l'équation (V.7);

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \quad (V.7)$$

Avec;

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \mu)^2}{n - 1}} \quad \text{et} \quad \mu = \frac{\sum x}{n}$$

Le coefficient de variation a été introduit en 1896 par Karl Pearson et visait, à l'origine, la comparaison de la variabilité des différentes distributions. Essentiellement, le CV sert à évaluer la dispersion d'une distribution.

Les émulsions sont considérées mono-dispersées si le coefficient de variation est inférieur à 5%. Dans le cas contraire, elles sont poly-dispersées (Sugiura et al., 2002).

V.5.9. Etude de l'activité cicatrisante

L'activité cicatrisante a été évaluée pour des émulsions contenant l'HE de *Thymus fontanesii*, le gel d'*Aloe arborescence* et la combinaison HE/ gel d'*Aloe arborescence*.

L'effet de cicatrisation a été étudié sur des rats mâles de souche Wistar. Des plaies d'incision ont été créées avec une lame de bistouri et nettoyées avec du coton avant application des émulsions.

L'étude a été réalisée sur quatre groupes de rats séparément.

- Le premier groupe a été traité quotidiennement avec une émulsion contenant l'HE de *Thymus fontanesii*,
- Le second avec l'émulsion contenant le gel d'*Aloe arborescens*,
- Le troisième avec l'émulsion de la combinaison (HE *Thymus fontanesii*/*Aloe arborescens*)
- Le quatrième avec le médicament Madecassol®, considéré comme témoin positif.

Sur chaque rat deux plaies identiques ont été réalisées; la première a été traitée par les trois émulsions, la seconde n'a reçu aucun traitement et sera considérée comme témoin négatif.

La Xylocaine à 2% a été utilisé comme anesthésique. La taille des plaies a été calculée via l'outil d'analyse d'images tous les trois jours jusqu'à guérison complète à partir du jour de l'excision de la plaie.

Comme le montre la figure V.5, la contraction de la surface de la plaie a été mesurée en utilisant la méthode d'analyse d'image par le logiciel ImageJ®.

Le pourcentage de réduction des plaies a été calculé suivant l'équation V.8 (Wilkinson et al., 2011);

$$\% \text{ cicatrisation} = \left(\frac{\text{Surface de la plaie}_0 - \text{Surface de la plaie}_n}{\text{Surface de la plaie}_0} \right) \times 100 \quad (\text{V.8})$$

Où,

Surface de la plaie₀ : représente la surface au jour 0.

Surface de la plaie_n ; représente la surface de la plaie au jour n avec n = 3, 6, 9, 12.

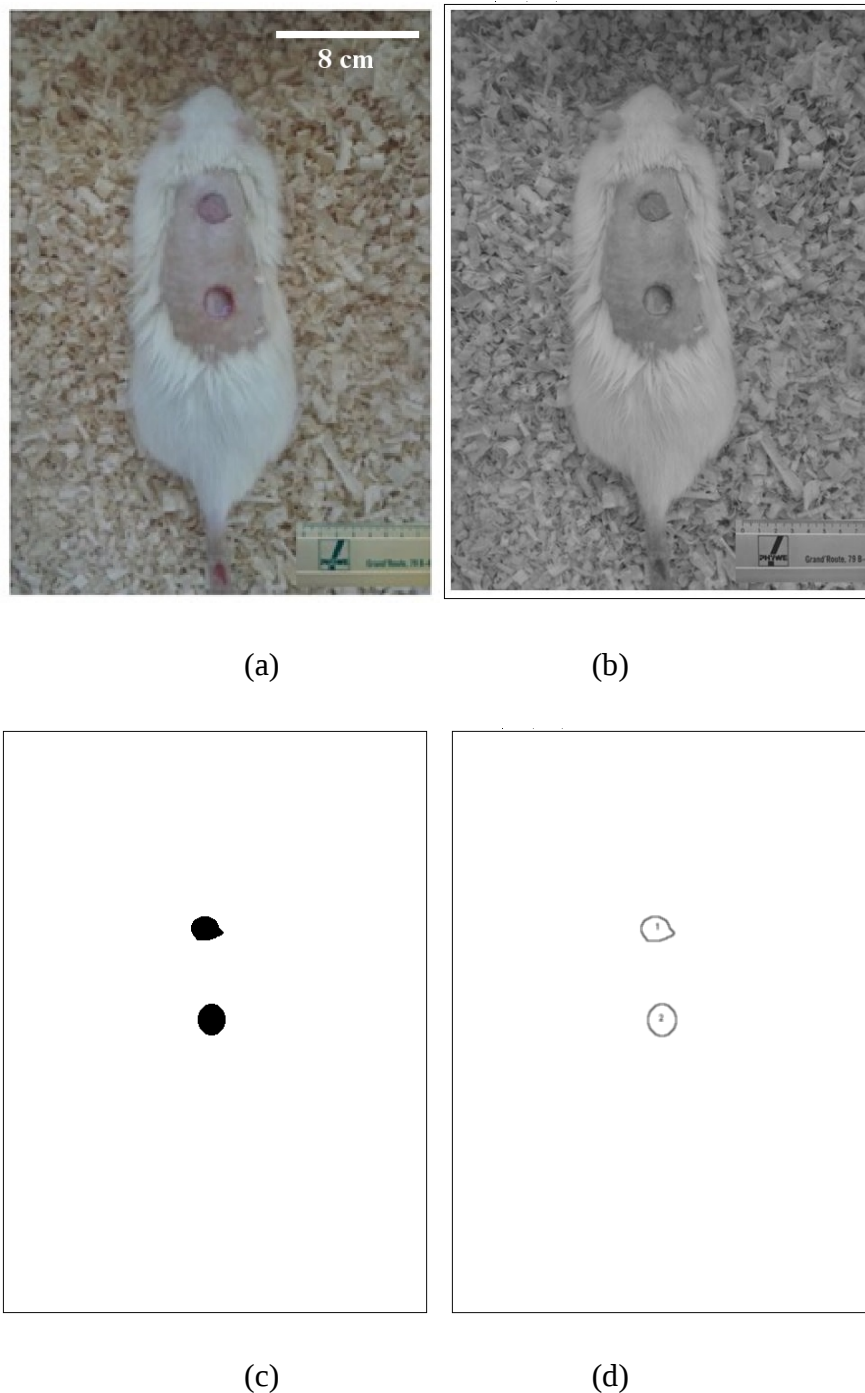


Figure V.5. Mesure de la surface des plaies: (a) image photographiée; (b) image 8BIT image; (c) binarisation; (d) taille des particules

V.5.10. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne arithmétique (M) des valeurs obtenues $\pm$ l'écart moyen (SEM) $[M \pm SEM]$. Le test t de *Student* a été utilisé pour évaluer la signification des effets des différentes substances testées. La différence est considérée statistiquement significative au risque de 5% ($p < 0.05$).

V.6. Résultats et discussions

V.6.1. Evaluation des paramètres morphologiques des feuilles d'*Aloe arborescens*

Le tableau V.3. Regroupe les résultats obtenus concernant les paramètres morphologiques des feuilles et leur rendement en gel.

Tableau V.3. Paramètres morphologiques des feuilles de l'*Aloe arborescens* et leur rendement en gel

Dimensions des feuilles (cm)			pH	Rendement (%)
Longueur	Largeur à la base	Largeur au milieu		
46±0,07	4,1±0,14	3,2±0,28	5,26±0,07	47,02±1,51

Les largeurs à la base et au milieu des feuilles respectivement sont égales à 4,1±0,14 cm, et 3,2±0,28 cm, on remarque que les feuilles sont plus larges à la base qu'au milieu. Le rendement du gel extrait des feuilles est de 47,02±1,51 % (Tableau V.3).

Les dimensions des feuilles de l'*Aloe arborescens* étudiées sont en accord avec celles de Zapata et al (2013) concernant la même espèce récoltée en Espagne (région d'Alicante) avec une longueur moyenne de 42,43 cm, une largeur à la base de 4,29 cm et une largeur à la moitié de 2,97 cm. Le rendement en gel a été trouvé plus élevé que celui de Zapata et al (2013), qui était égal à 38,1%.

V.6.2. Concentration en composés phénoliques totaux du gel d'*Aloe arborescens*

La valeur moyenne de la concentration en polyphénols totaux d'extraits de l'*Aloe arborescens* est calculée à partir des valeurs des absorbances à une longueur de 765 nm en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La concentration phénolique totale du gel (plante récoltée en Avril), est d'environ 16,0 ± 0,75 mg GAE pour 100 g de poids frais, en accord avec les résultats trouvés par Zapata et al. (2013) qui ont démontré que la concentration phénolique totale dans le gel de l'*Aloe arborescens* est comprise entre 12 et 50 mg Eq AG/ 100g FW.

Selon Zapata et al. (2013), il existe une forte variabilité saisonnière de la teneur totale en phénol. Ces composés atteignent leurs valeurs minimales au printemps et les maximums en été, car une température élevée peut induire une accumulation phénolique.

V.6.3. Taux de miscibilité entre l'huile essentielle de *T. fontanesii* et le gel d'*Aloe arborescens*

Afin d'évaluer le degré de miscibilité des deux extraits étudiés, on a préparé des combinaisons d'HE et de gel à des concentrations de 10, 50, 75 µl de l'HE de *T. fontanesii* dans 200 µl de gel de l'*Aloe arborescence*.

Comme le montre le tableau V.4, le taux de miscibilité a été trouvé plus important à faibles proportions. En d'autres termes, l'utilisation d'une faible proportion, telle que 1/20, a donné une miscibilité entre l'HE et le gel d'environ 99%; Alors que la miscibilité ne dépassait pas 80% pour le rapport 7,5/20. Par conséquent, la proportion de 1/20 a été prise comme meilleure proportion dans la formulation des émulsions utilisées pour cette étude.

Tableau V.4. Degré de miscibilité entre le gel et l'HE (%)

Proportion (v/v)	1/20	5/20	7,5/20
Taux de miscibilité (%)	99	85,29	79,87

V.6.4. Contrôle des émulsions et examen microscopique

Les résultats des contrôles pour les trois émulsions ont prouvé leur grande consistance et leur bonne propagation, ainsi que leur bonne adhérence cutanée. L'évaluation de l'homogénéité des émulsions a été basée sur l'examen macroscopique et microscopique en surveillant la dispersion des excipients.

Le pH des émulsions à base d'HE de thym est d'environ 6,2. Cependant, le pH des émulsions à base de gel d'Aloe est d'environ 5,7.

D'après ces valeurs de pH (non acide) nous pouvons dire que ces émulsions ne provoqueront pas d'irritation sur la peau.

Aussi, pour chacune des émulsions, des photographies par microscopie optique ont été réalisées. La figure V.6 illustre quelques unes d'entre elles.

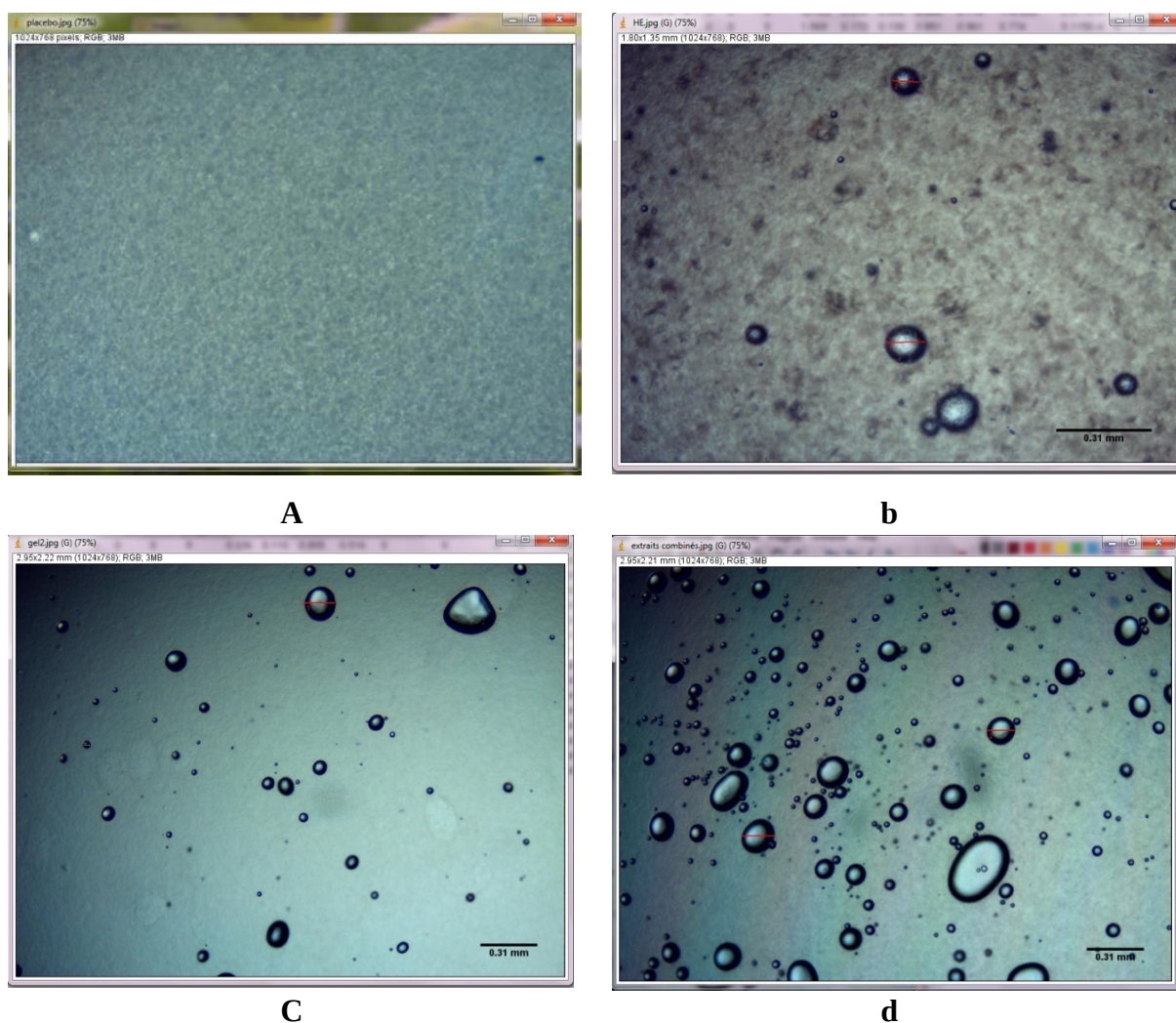


Figure V.6. Photographies prises au microscope optique des émulsions réalisées; a) Placebo, b) Emulsion contenant l'HE de *Thymus fontanesii* à 0,1%, c) Emulsion contenant le gel d'*Aloe arborescens* à 2% et d) Emulsion contenant les extraits combinés.

La mesure du diamètre individuel de chacune des gouttes est réalisée, par analyse des images microscopiques, avec le logiciel ImageJ®.

Ainsi, le coefficient de variation de la répartition de la taille a été calculé pour chaque émulsion. Ce résultat est supérieur à 5%, ce qui signifie que les émulsions réalisées sont polydispersées.

V.6.5. Evaluation de l'activité cicatrisante

Cette étude vise à étudier les propriétés cicatrisantes de l'HE de *Thymus fontanesii* et celles du gel d'*Aloe arborescens* individuellement ou en combinaison, par rapport à un cicatrisant de référence (Madecassol®).

Le tableau V.5 indique l'évolution des surfaces des plaies au cours de la durée du traitement.

Tableau V.5. Evolution des surfaces des plaies (cm²) au cours de la durée du traitement

Groupe		Surfaces des plaies (cm ²) (moyenne ± SEM)				
		Jour 0	Jour 3	Jour 6	Jour 9	Jour 12
Emulsion contenant l'HE de <i>Thymus fontanesii</i> à 0.1%	Plaies traitées	1,865±0,205	1,276±0,113	0,791±0,172	0,226±0,022	0,027±0,487
	Plaies non traitées	1,492±0,192	1,472±0,288	1,140±0,213	0,343±0,043	0,113±0,066
Emulsion contenant le gel d' <i>Aloe arborescens</i> à 2%	Plaies traitées	1,744±0,153	1,631±0,131	0,682±0,311	0,124±0,032	0
	Plaies non traitées	1,686±0,094	1,510±0,287	1,009±0,238	0,505±0,267	0,262±0,077
Emulsion contenant les extraits combinés	Plaies traitées	1,725±0,308	1,595±0,103	0,503±0,158	0,092±0,027	0
	Plaies non traitées	1,771±0,257	1,655±0,171	1,153±0,250	0,405±0,185	0,106±0,076
Madecassol®	Plaies traitées	1,767±0,216	1,467±0,329	0,968±0,222	0,222±0,092	0
	Plaies non traitées	1,817±0,157	1,712±0,187	1,017±0,175	0,456±0,037	0,125±0,002

ESM= Erreur standard moyenne de six échantillons par groupe

A partir du jour 0, on constate que les surfaces des plaies moyennes sont homogènes. Au troisième jour de l'expérience, une réduction significative de la surface traitée moyenne des plaies a été observée.

Les valeurs étaient légèrement supérieures à celles des plaies non traitées (témoin négatif) pour toutes les préparations (Emulsion contenant l'HE de *Thymus fontanesii* à 0,1%, Emulsion contenant le gel d'*Aloe arborescens* à 2%, Emulsion avec des extraits combinés et le témoin positif). Atteignant le 6ème jour, les surfaces traitées moyennes des plaies sont d'environ de moitié relativement à celle des plaies initiales.

L'émulsion avec les extraits combinés a produit au sixième jour une diminution maximale des surfaces des plaies avec une valeur de 0,503 cm² contre une valeur de 1,595 cm² sur les plaies antérieures de trois (03) jours.

Le 9^{ème} jour, une réduction très significative se situant entre 86 et 94% a été observée pour toutes les émulsions (figure V.7). Cette réduction est remarquablement importante, de 0,503 à 0,092 cm², au sein de la plaie traitée par l'émulsion contenant les extraits combinés.

En comparaison, pour chaque groupe traité, les surfaces moyennes finales à celles initiales (au 12^{ème} jour), 98% de contraction de la plaie ont été trouvées pour l'HE de *Thymus fontanesii* à 0,1% et une cicatrisation complète pour les autres cas.

Les contrôles négatifs ont montré 91% de guérison due à l'auto-immunité des animaux.

Un histogramme présentant les proportions des contractions des plaies est illustré par la figure V.7.

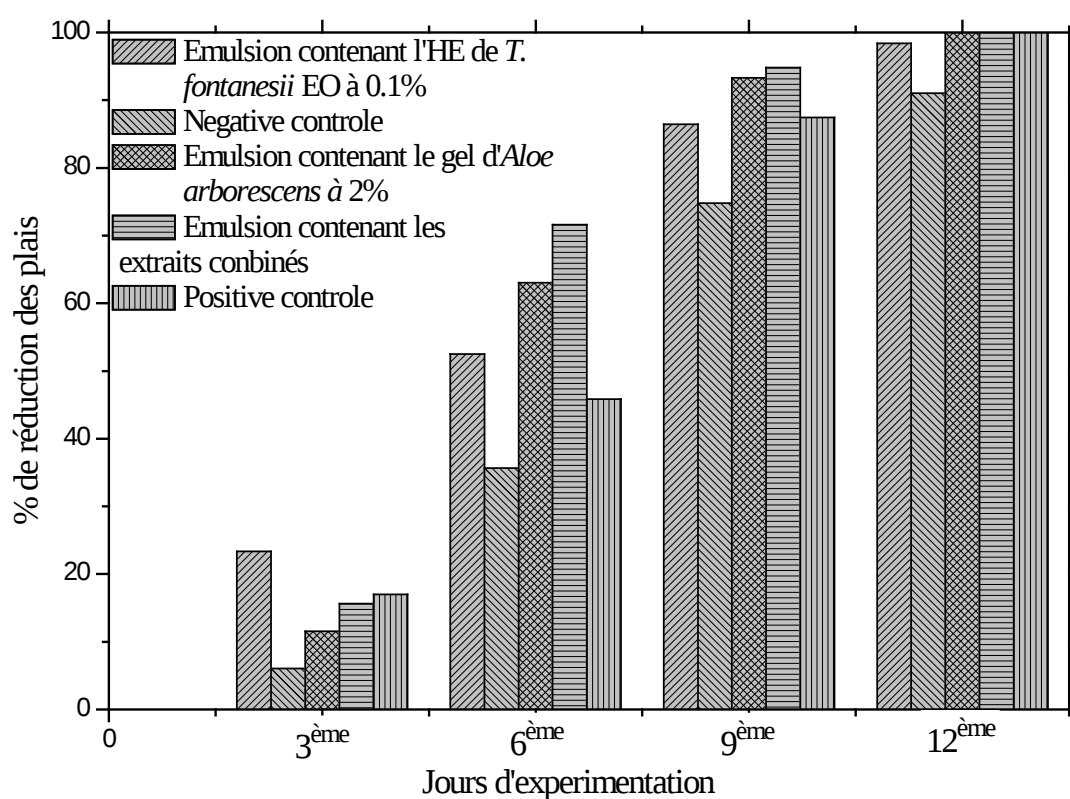


Figure V.7. Evolutions des pourcentages de réduction des plaies.

La cicatrisation est un phénomène naturel de reconstruction d'une zone lésée. Lors du processus de guérison des plaies, la formation d'un nouveau tissu commence par le ré-épithélialisation qui est suivie d'une formation d'un tissu de granulation. Le processus ultérieur englobe l'accumulation de macrophages et la formation des matrices. Toutes ces formations sont entraînées en partie par un mélange complexe de produits d'acide arachidonique et de cytokines (Ward & Till., 1990).

La formation du tissu de granulation permet la réparation dermique et épidermique grâce à la synthèse de collagène et à la prolifération de kératinocytes, de fibroblastes et de néovaisseaux.

Concernant la réparation dermique, c'est la phase inflammatoire qui grâce aux nombreux médiateurs chimiques libérés, aboutit à l'activation des fibroblastes. Ces derniers, activés, migrent vers le foyer inflammatoire, où ils sont retrouvés à partir du troisième jour. Ils assurent, essentiellement à partir du cinquième jour, la synthèse de collagène, de glycoprotéines et de protéoglycannes

Concernant la réparation épidermique, c'est la ré épithélialisation qui assure la couverture finale de la plaie par un épithélium stratifié et kératinisé, formé à partir des cellules épidermiques provenant des berges du foyer cicatriciel.

La dernière phase du processus est représentée par la phase de contraction. Il s'agit d'un mécanisme de réduction de la taille de la plaie par le mouvement centripète du tissu cutané entourant la plaie. C'est un processus dans lequel les fibroblastes joueraient un rôle du premier plan se produisant sept jours après la blessure, et son activité atteint un pic après deux semaines (Allas, 1997).

L'émulsion contenant l'HE de *Thymus fontanesii* a présenté une activité cicatrisante significative chez les rats, ce qui a été confirmé en mesurant le taux de contraction des plaies. Alors que l'émulsion contenant le gel d'*Aloe arborescens* à 2% a montré une cicatrisation complète et rapide des plaies car certains de ses composants augmente la synthèse du collagène en activant la production de cytokines et de macrophages.

Les polysaccharides contenus dans le gel des Aloès seraient bénéfiques pour la protection des cellules épithéliales en favorisant la prolifération cellulaire en induisant les cellules épidermiques. Aussi, l'acide ascorbique contenu dans les Aloès améliore la synthèse du collagène (Stone et al., 1956). Le gel étant constitué essentiellement d'eau, il empêche le dessèchement de la plaie et augmente la migration des cellules épithéliales (Niciforovic et al., 2007). Aussi, le gel de l'Aloe possède une grande affinité avec la peau. De composition riche et complexe, il stimule la cicatrisation et le renouvellement cellulaire, en favorisant la synthèse du collagène (Martni & Seiller, 2006).

En ce qui concerne le Madécassol®, Shetty et al. (2008) ont signalé que les principaux constituants de l'extrait titré de *Centella asiatica* (Asiaticoside, l'acide asiatique et madécassique) raccourcissent considérablement le temps de cicatrisation. Leur effet le plus bénéfique semble être la stimulation de la maturation des cicatrices suite à la production de collagène et la diminution de la réaction inflammatoire et la production de myofibroblastes

L'émulsion contenant les extraits combinés nous a permis d'obtenir une cicatrisation plus rapide et complète par rapport au contrôle positif (Madécassol ®). Par conséquent, en utilisant une combinaison de l'HE de *Thymus fontanesii* avec le gel d'*Aloe arborescens* montre une meilleure efficacité que leurs applications individuelles.

Ce résultat obtenu est dû à l'effet de l'HE du thym, qui est très efficace contre différentes bactéries (Hazzit et al., 2009) car généralement, les infections des plaies sont causées par l'abondance des bactéries ou des champignons d'un côté, et l'efficacité cicatrisante de l'*Aloe arborescens* de l'autre côté.

V.7. Conclusion

Afin d'évaluer l'aptitude de l'HE de *Thymus fontanesii* ainsi que le gel d'*Aloe arborescens* à cicatriser, des formulations ont été préparées.

La combinaison HE (thym)/ gel (*Aloe arborescence*) a été effectuée pour évaluer l'activité cicatrisante du mélange.

Les proportions des fractions des mélanges préparés ainsi que le contrôle des émulsions ont été déterminées via l'outil d'analyse d'images par le biais du logiciel «ImageJ ®». L'avantage de cette approche réside dans la simplicité de la technique et de séquences de traitement et donc dans une réduction du temps de traitement par rapport aux autres techniques d'analyse. Ainsi, en facilitant le travail de caractérisation, l'analyse d'images permet d'augmenter le nombre de mesures et donc la représentativité des mesures.

La formulation des émulsions est réalisée à petite échelle dans le respect des bonnes pratiques de fabrication et en s'inspirant du procédé de fabrication d'une émulsion ajustée pour obtenir un produit répondant à tous les critères.

L'émulsion avec les extraits combinés a permis d'obtenir une cicatrisation complète et ceci avec un temps inférieur à celui des autres émulsions.

Les résultats obtenus dans ce chapitre ont démontré l'effet synergique de l'utilisation des extraits combinés car leur association donne de meilleurs résultats comparativement à leurs utilisations individuelles.

Conclusion Générale et Perspectives

Dans ce travail, nous avons proposé de réaliser une étude sur l'association des huiles essentielles et leur efficacité vis à vis des activités biologiques et pharmacologiques. La plante de base considérée est une espèce de thym originaire d'Algérie qui est le *Thymus fontanesii*. L'huile essentielle des feuilles de cette plante a été caractérisée, valorisée et associée à d'autres huiles et extraits de plantes.

La première partie de cette étude, a été consacrée à la caractérisation et la valorisation de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* récoltée dans la région de Médéa. L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* est extraite par hydrodistillation au moyen d'un appareil type Clevenger.

De cette partie nous avons pu montrer que :

- Le rendement moyen en huile essentielle obtenu dans les conditions optimales est de $2,4 \pm 0,46$, presque similaire à celui obtenu pour les régions de Mostaganem et de Sétif et plus important que celui obtenu pour la région de Djelfa.
- Du point de vue qualitatif, une grande similitude des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques déterminées pour cette huile essentielle est observée en comparaison avec celle décrite par la norme AFNOR et les autres travaux.
- La caractérisation de l'huile essentielle obtenue dans les conditions optimales par CPG/SM a révélé la présence d'un composé majoritaire le Carvacrol (66,3%). Son isomère, le thymol, est estimé pour seulement 0,159% de la composition, ce qui a permis de noter que l'espèce de thym étudiée est à chémotype (Carvacrol).
- Les deux modèles proposés par la littérature décrivent convenablement la cinétique de l'extraction des huiles essentielles des feuilles de *Thymus fontanesii* par hydrodistillation.
- La localisation des organes de sécrétion de l'essence de cette plante par microscopie électronique à balayage, a révélé que les sites sécréteurs sont uniformes et situés à la surface de la matrice végétale. Ce fait traduit l'extraction rapide confirmée par la courbe de la cinétique de l'extraction.
- Cette huile essentielle ne présente aucune toxicité et a montré une activité anti-oxydante modérée par rapport à celle de l'anti-oxydant de référence (BHT).
- Cette huile essentielle a montré une inhibition maximale de l'inflammation révélée par les deux méthodes : la première qui est l'inflammation de la patte et a été déterminée par la technique d'analyse d'image. La seconde méthode est l'inflammation de l'oreille.

Cette activité anti-inflammatoire est due à la capacité du Carvacrol à réduire la production des médiateurs inflammatoires.

- De même, Cette huile essentielle assure une protection de la muqueuse gastrique contrairement aux anti-inflammatoires de synthèse.
- Il est à souligner que la méthode d'analyse d'image se caractérise par le fait qu'elle est non intrusive et respecte l'intégrité physique de l'animal. Elle gagnerait à être normalisée.

La deuxième partie de cette étude, a été consacrée à la valorisation de l'association de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* avec d'autres huiles essentielles et extrait de plantes.

L'activité antimicrobienne a été évaluée pour l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* seule, ainsi qu'en association avec les huiles essentielles de la Menthe poivrée (*Mentha piperita*) et de l'orange douce (*Citrus sinensis*).

Dans cette partie, nous avons proposé également, une formulation pharmaceutique, cicatrisante à base de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* associée au gel d'une *Aloe* qui est l'*Aloe arborescens*. Trois formulations sont réalisées, la première à base de l'huile essentielle de *Thym*, la seconde à base du gel d'*Aloe* et la troisième à base des deux principes actifs associés.

De cette deuxième partie, on peut en déduire que:

- L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* a une forte activité inhibitrice sur toutes les souches bactériennes et fongiques testées.
- Les CMI observées pour les bactéries à Gram+ et les fongiques sont inférieures ou égales à 0,312 µl/ml, celles des bactéries à Gram- sont inférieures ou égales à 0,625 µl/ml excepté pour la souche *Pseudomonas aeruginosa*.
- Concernant l'étude des associations des huiles essentielles, le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *T. fontanesii* dissoute dans celle de *Citrus sinensis* et dans celle de *Mentha piperita* reste important. En revanche, les deux autres huiles essentielles ont montré un pouvoir antimicrobien plus fort relativement à leur huile essentielle prises individuellement.
- Les tests de contrôle qualité réalisés sur les formulations proposées (homogénéité, pH) ont montré qu'elles sont conformes aux normes pharmaceutiques.

- L'étude de l'activité cicatrisante des formulations nous a permis de constater que celle obtenue avec les extraits combinés permet d'obtenir une cicatrisation complète et ceci avec un temps inférieur à celui des autres formulations. Un effet synergique a été observé, car cette association a donnée de meilleurs résultats par rapport à l'utilisation des deux extraits testés individuellement.
- Le processus de guérison a été évalué à travers plusieurs étapes telles que la disparition progressive de l'inflammation et la phase de contraction. Généralement, les infections des plaies sont causées par l'abondance des bactéries et/ou des champignons. L'huile essentielle de thym, a montré son efficacité sur les différentes souches microbiennes et a contribué positivement à une cicatrisation plus rapide.

Cette étude reste une approche tendant à cerner les bienfaits que peuvent nous procurer les plantes dans le domaine thérapeutique. Les plantes présentent un intérêt particulier dans leurs potentielles applications, car elles permettent de réduire les effets secondaires des traitements chimiques actuels et limitent le développement des phénomènes de résistance par les phénomènes combattus.

Comme perspective dans la continuité de ce travail, il serait intéressant de le compléter par;

- La proposition d'une forme pharmaceutique à usage interne en exploitant les résultats des associations étudiées;
- L'étude d'autres associations pour élargir le spectre biologique de l'huile essentielle de la plante de base, notamment pour le potentiel antioxydant;
- La caractérisation rhéologique des émulsions proposées;
- La réalisation d'une étude sur les modes de libération des principes actifs de l'émulsion proposée (extraits combinés), sachant que ces derniers représentent un mélange de composés qui diffèrent par leur structure et leur polarité.

References

bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Adams, R. P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry (4th ed.). Carol Stream IL: Allured Publishing Corporation.
- Adwan, G., Abu-Shanab, B., Adwan, K., Abu-Shanab, F. 2006. Antibacterial Effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*. Turkish J. Biol; 30: 239-242.
- AFNOR. 2000. Échantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1)- Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2).
- Aguilar-González, A.E., Palou, E., & López-Malo, A. 2015. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. Innov. Food Sci. Emerg. Technol; 32: 181-185.
- Al-Bayati, F.A. 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. J Ethnopharmacol; 116: 403-406.
- Allas, S. 1997. Effets et mécanismes d'actions d'extraits plaquettaires de porc sur la cicatrisation cutanée par première et seconde intention. Thèse d'obtention du grade de Philosophiae Doctor en sciences biomédicales, Montréal 1997, 141P.
- Alma, M.H., Mavi, A., Yildirim, A., Digrak, M., Hirata, T. 2003. Screening chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum Syriacum* L. growing in Turkey. Biol Pharmaceut Bull; 26:1725-1729.
- Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El Ajjouri, M., Chaouch, A. 2010. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut .et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth . Du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ; 14(1): 141-148.
- Amouzoun, L.A.L., Agbonon, A., Ekl-Gadegbeku, K., Aklikokou, k., Gbéassor, M. 2008. Activités antipyrétique et anti-inflammatoire d'extraits hydro-alcooliques des racines et feuilles de *Nauclea latifolia* Smith (Rubiaceae) chez le rat Wistar. Rev Phytother; 6: 228.
- Anekpankul, T., Goto, M., Sasaki, M., Pavasant, P., Shotipruk, A. 2007. Extraction of anti-cancer damacanthol from roots of *Morinda citrifolia* by subcritical water. Sep Purif Technol; 55: 343–349.
- Anton, R., Lobstein, A. 2005. Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris, Lavoisier, 522p. (Technique et Documentation).
- Aronoff, D.M., Oates, J.A., Boutaud, O. 2002. New insights into the mechanism of action of acetaminophen: Its clinical pharmacologic characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H₂ synthases. Clin. Pharmacol. Ther; 79: 9-19.
- Arulmozhi, D. K., Veeranjanyulu, A., Bodhankar, S. L., & Arora, S. K. 2005. Pharmacological investigations of *Sapindus trifoliatus* in various *in vitro* and *in vivo* models of inflammation. Indian J Pharmacol ; 37: 96–102.

- Baba Aissa, F. 2011. Encyclopédie des plantes utiles. Flore Algérienne. Plantes méditerranéennes (Maghreb, Europe méridionale). Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Plantes médicinales, plantes aromatiques, plantes alimentaires. Editions el Maarifa: 42-43.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils- A review. Food Chem Toxicol; 46: 446-475.
- Ballard, D & Brown, C.M. 1982. Computer Vision. Prentice- hall, INC. Englewood Cliffs, Nex Jersey 07632.
- Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., Del Pezzo, M., Lavitola, A. 2006. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italic* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. J. Ethnopharmacol; 10: 240-248.
- Bassetti, A & Sala, S. 2005. The great aloe book history, botany, composition and pharmacological aspects of this legendary plant. Zuccari editions. 1. 191p.
- Bassolé, I.H.N; Lamien-Meda, A; Bayala, B; Tirogo, S; Franz, C; Novak, J; Nebié, R.C., Dicko, M.H. 2010. Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination. Molecules; 15: 7825-7839.
- Bastian, P., Fal, A.M., Jambor, J., Michalak, A., Noster, B., Sievers, H., Steuber, A., Marcinek, W.N. 2013. Candelabre aloe (*Aloe arborescens*) in the therapy and prophylaxis of upper respiratory tract infections: traditional use and recent research results: 1-2.
- Bauer, K., Garbe, D. and Surburg, H. 2001. Common Fragrance and Flavor Materials, Wiley-VCH, p. 161.
- Bekhechi, C., Bekkara, F.A., Abdelouahid, D.E., Félix, T., & Casanova, J. 2007. Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. from Algeria. J. Essent. Oil Res; 19 (6): 594-596.
- Belaiche, P. 1979. L'aromatogramme : traité de phytothérapie et d'aromathérapie, Tome 1. M. S. A. Editeur, Paris, 204p.
- Benjilali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ismaïli-Alaoui, M., Ayadi, A. 1986. Méthode d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plant Médicinal Phytotherapy; 20: 155-167.
- Bouaoun, D., Hilan, C., Garabeth, F. et Sfeiral, R. 2007, Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss. Phytothérapie 5: 129.
- Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Skali, N.S., Abrini, J. 2006. Thymus essential oils: Chemical composition and in vitro antioxydant and antibacterial activities. (Congrès international de Biochimie.). Agadir

Boukhatem, M.N., Kameli, A., Ferhat, M.A., Saidi, F., Tayebi, H. 2014. The food preservative potential of essential oils: is lemongrass the answer? *J Verbr Lebensm*; 9: 13-21.

Boukhatem, M.N., Kameli, A., Ferhat, M.A., Saidi, F., Tayebi, H., Teffahi, D. 2014. Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris* L.) en aromathérapie anti-infectieuse. *IJIAS*; 8(4): 1418-1431

Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M.G., Faleiro, L., Rejeb, M.N., Neffati, M., Costa, M.M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. 2007. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chem*; 105: 146-155.

Bousbia, N. 2011. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Université d'Avignon; Ecole Nationale Supérieure Agronomique (Ex – INA El Harrach – Alger).

Bousbsia, N., Vian, M., Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. 2008. A new process for extraction of essential oil from citrus peels: microwave hydrodiffusion and gravity. *J Food Eng*; 90: 409-413.

Bozin, B., Mimika-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*; 54:1822–1828.

Brater, D. C. 2002. Anti-inflammatory agents and renal function. *Seminars in Arthritis Rheum*; 32: 33–42.

Brochette, P.1999. Émulsification: Elaboration et étude des émulsions.

Bruneton, J. 1987. *Eléments de phytochimie et de pharmacognosie*. Ed. Technique et Documentation - Lavoisier, Paris, 585p.

Bruneton, J. 1993. *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales*. 2^{ième} éd. Tec. et Doc., Lavoisier, Paris, France , 623p

Bruneton, J. 1995. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Paris, Lavoisier, 915p. (Technique et Documentation).

Burits, M., Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res*; 14: 323-328

Burt, S. 2004. Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods: a review. *Int. J. Food Microbiol*; 94: 223–253.

C

Capon, M., Courilleau, V., Valette, C. 1993. *Chimie des couleurs et des odeurs*. Ed. Cultures et techniques, Nantes. 255 P.

Chalchat, J.C., Garry, R.F., Michet, A. 1997. Variation of the Chemical Composition of Essential oil of *Mentha piperita* L during the growing time. *Essent. Oil Res*; 9: 463-465.

Chemat, S., Aït-Amar, H., Lagha, A., Esveld, D. C. 2005. Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds. *Chem. Eng. Process*; 44: 1320-1326.

Chen, S.S., Spiro, M. 1994. Study of Microwave Extraction of Essential Oil Constituents from Plant Materials. *J Micro Power Electromagn Energy*; 29: 231-241.

Chitra, P., Sajithlal, G.B., Chandrakasan, G. 1998a. Influence of *Aloe vera* on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. *Mol. Cell Biochem*; 181: 71-76.

Chitra, P., Sajithlal, G.B., Chandrakasan, G. 1998b. Influence of *Aloe vera* on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *J. Ethnopharmacol*; 59: 195-201.

Clevenger J.F., 1928. Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc*; 17: 336-341.

Conférence de consensus *Helicobacter pylori* : Révision (1999). Conclusions et recommandations révisées du groupe de travail. *Gastroenterol Clin Biol*. 23: C 95– 104.

Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E & Palmas, F. 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *J Appl Microbiol*; 29: 130-135.

D

Da Silva, L. M., Quintans, J. L., Alcantara De-Santana, W., Martins, K. C., & Botelho, P. S. M. 2013. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. *Eur J Pharmacol*; 699: 112–117.

De Hoffmann E., Charette J., Stroobant V., 1999, *Spectrométrie de Masse*, 2e édition, Librairie Dunod, Paris.

Denny, E. F. K. 1991. Field distillation for herbaceous oils (2nd ed.). Lilyte, Australia: Denny & Mckenzie Associate, 210p.

Desai, M.A., Parikh, J., Kumar De, A. 2014. Modelling and optimization studies on extraction of lemongrass oil from *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. *Chem. Eng. Res. Des* ; 9 2: 793-803.

Djouahri, A., Saka, B., Boudarene, L., Baaliouamer, A. 2015. Geographic's variation impact on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils from wood and leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Ind. Crops Prod*; 63: 138-146.

Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., & Chelghoum, C. 2006. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii*. *Pharm Biol*; 44(8): 607-612.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*; 88: 308-16.

Dorman, H.J.D., M. Kosar, K. Kahlos, Y. Holm and R. Hiltunen. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J.Agric. Food Chem*; 51: 4563-4569.

Dursun, N., Liman, N., Ozyazgan, I., Gunes, I., Saraymen, R. (2003). Role of thymus oil in burn wound healing. *J. Burn Care Rehabil*; 24: 395-339

E

El-Bouzidi, L., Jamali, C. A., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuth, H., & Leach, D. 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Ind Crop Prod*; 434: 50–60.

F

Fachini-Queiroz, F.C., Kummer, R., Estevao-Silva, C.F., & Cuman, R.K.N. 2012. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 657026.

Fadil, M., Farah, A., Ihssane, B., Haloui, T., & Rachiq, S. 2014. Application de plan de Plackett Et Burman dans le criblage des paramètres agissants sur le processus d'hydrodistillation de Thym du Maroc (*Thymus vulgaris* L.). *IJIAS*; 6(3): 530-540.

Femenia, A., S, Sanchez, E., Simal, S., Rossello, C. 1999. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate Polymers*; 39: 109–117.

Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., Chemat, F. 2007. Comparison of different isolation methods of essential oil from *Citrus* fruits: Cold pressing, hydrodistillation and microwave ‘dry’ distillation. *Flavour and Fragrance Journal*; 22: 494-504.

Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Smadja, J., Chemat, F. 2006. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *J. Chromatogr. A*; 1112: 121-126.

Fleurentin, J., Hayon, J.C. 2007. Les plantes qui nous soignent: traditions et thérapeutique. Rennes: Éd. "Ouest-France.

Frolich, J. C. 1997. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *T.I.P.S*; 18: 30-40.

Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., Efferth, T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother Res*; 21 (10): 989-994

G

Ghannadi, A., Sajjadi, S.E., Kabouche, A., & Kabouche, Z. 2004. *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. – A Potential Source of Thymol-Rich Essential Oil in North Africa. *Z. Naturforsch*; 59: 187-189.

Gilles, M., Zhao, J., An, M., & Agboola, S. 2010, Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chem*; 119(2): 731-737.

Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., Nerín, C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Food Chem; 116(4): 982-989.

H

Habbu, P.V., Joshi, H. and Patil, B.S. 2007. Potential wound healers from plant origin. Pharmacogn Rev; 1(2): 271-281.

Haddouchi, F., Lazouni, H.A., Meziane, A., & Benmansour, A. 2009. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. Afrique Sci; 05(2) : 246-259.

Hadhili, L., Romdhane, M., Abderrabba, M. Extraction de l'huile essentielle de thym (*Thymus capitatus*): Etude quantitative et qualitative de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation et entraînement à la vapeur. International symposium on perfume, aromatic and medicinal plants: from production to valorization- SIPAM; 2-4 November; Jerba -Tunisia. 2006.

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol ; 86(6): 985-990.

Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G. 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. Food chem; 116: 714-721.

Hellal Z. 2011. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus. Application sur la sardine. Mastère, faculté des sciences agronomiques, Algérie, 120p.

Hotta, M., Nakata, R., Katsukawa, M., Hori, K., Takahashi, S., & Inoue, H. 2010. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARα and C and suppresses COX-2 expression. J. Lipid Res; 51: 132–139.

Huth, J., Buchholz, M., Kraus, J.M, Mølhave, K., Gradinaru, C., Von Wichert, G., Gress, T.M, Neumann, H., Kestler, H.A. 2011. Time Lapse Analyzer: Multi-target analysis for live-cell imaging and time-lapse microscopy. Comput Methods Programs Biomed; 104: 227-234.

I

Inngjerdingen, K., Nergård, C. S., Diallo, D., Mounkoro, P.P. & Paulsen, B. S. 2004. An ethno pharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, west Africa. J Ethnopharmacol; 92: 223 – 244.

Iserine., P. 2001. Encyclopédie des Plantes Médicinales : identification, préparations, soins. 2ème édition, Larousse. Paris :44-45.

J

Jordan, M.J., Martinez, R. M., Goodner, K.L., Baldwin, E.A., & Sotomayor, J.A. 2006. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. Ind Crop and Prod; 24(3): 253- 263.

Joulain, D. 1994. Method for analysing essential oil. Modern analysis methodologies: use and abuse. *Perfumer & Flavorist*; 19: 5-17.

Jukić, M., Miloš, M. 2005. Catalytic oxidation properties of thyme essential oils (*Thymus Vulgarae* L.). *Croat. chem. acta*; 78: 105–110.

Juliano C, Mattana A, Usai M. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Essent. Oil Res*; 2000: 12:516-22.

K

Kerner, S., Etienne, D., Malet, J., Mora, F., Monnet-Corti, V., Bouchard, P. Root coverage assessment: validity and reproducibility of an image analysis system. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 969–976.

Kim, D.O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.Y., Lee, C.Y. 2003. Quantification of Polyphenolics and their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *J. Agric. Food Chem*; 51: 6509-6515.

Kim, J.W., Mazza, G. 2006. Optimization of extraction of phenolic compounds from flax shives by pressurized low-polarity water. *J Agric Food Chem*; 54: 7575–7584.

Kokkini, S. 1991. Chemical races within the genus *Mentha* L. in H. F. Linskens and J. F. Jackson, eds., *Modern methods of plant analysis, new series*; 12: 61-75. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Komali, A.S., Zheng, Z., Shetty, K. 1999. A mathematical model for the growth kinetics and synthesis of phenolic in oregano (*Origanum vulgare*) shoot cultures inoculated with *Pseudomonas* species. *Process Biochem*; 35: 227-235.

Kon, K. V., Rai, M. K. 2012. Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther*; 10: 775–790.

Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. drancunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *J Agr Food Chem*; 53:9452-9458.

Krokidaa, M., Pappab, A., Agalotia, M., 2011. Effect of drying on Aloe's functional components. *Procedia Food Sci*; 1: 1523-1527.

Kubàtovà, A., Jansen, B., Vaudoisot, J. F., & Hawthorne, S. B. 2002, Thermodynamic and kinetic models for the extraction of essential oil from savory and polycyclic aro-matic hydrocarbons from soil with hot (subcritical) water and supercritical CO₂. *Journal of Chromatography A*; 975: 175–188.

Kulkarni, M.G., Amoo, S.O., Kandari, L.S., Staden, J., 2013. Seed germination and phytochemical evaluation in seedlings of *Aloe arborescens* Mill. School of Life Sciences, Research Centre for Plant Growth and Development, University of KwaZulu-Natal Pietermaritzburg, South Africa. 8 p.

L

Lagunez-Rivera, L. 2006. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol*; 91(3): 453-462.

Lawrence, B.M. 1978. A study of the monoterpene interrelationship in genus *Mentha* with spécial reference to the origin of pulegone and menthofuran, *PhD Thesis, Griningen State University, Groningell*.

Li, X. Q., Andersson, T. B., Ahlstrom, M., & Weidolf, L. 2004. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome activities. *Drug Metab Dispos*; 32: 821-827.

Li, Y. 2009. The health efficacy of *Aloe* and its development and utilization. *Asian Soc Sci*; 5(9): 4.

Lichtenstein, D. R., Syngal, S., & Wolfe, M. M. 1995. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract, the double-edged sword. *Arthritis Rheum*; 38: 05–18.

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

M

Maldao, M., Palovra, A., Beiraro De Costa, M.L., Bernardo, M.G. 2000. Supercritical CO₂ extraction of *Thymus zygis* L. *Subsp. Sylvertis* aroma. *J Supercrit Fluids*; 18: 25-34.

Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.MF. Araujo, M.E.M. 2007. Antioxydant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese Food spices. *Food chem*; 103: 778-786.

Mebarki, N. 2010. Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Mémoire de Magister en Technologie des hydrocarbures, Département Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques; Université M'Hamed Bougara – Boumerdes, Algérie.

Mignon, M. 1992. Gastro-Entérologie: Précis des maladies de l'appareil digestif. Edition Ellipes, Paris.

Miller, L. C., & Tainter, M. L. (1944). Estimation of LD50 and its error by means of log-probit graph paper. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 57, 261.

Mimica-Dukic, N., Božin, B., Sokovic, M., Simin, N. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. J Agr Food Chem; 52: 2485-2489.

Moller, J.K.S., Madsen, H.L., Altonen, T., Skibsted, L.H. 1999. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. Food Chem; 64(2): 215–219.

Moradi, M., Najafian, S.H. 2015. Comparative analysis of the aroma chemicals of *Mentha piperita* L. using hydrodistillation and CombiPAL system techniques. IJFAS; 4(2):89–94.

Morales, R. 1997. Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area. Lagasalia; 19: 249-262.

Moyler, D. 1998. CO₂ extraction and other new technologies: an update on commercial adoption. International Conference on Essential Oils and Aroma's. IFEAT. 33-39, London.

N

Niciforovic, A., Adzic, M., Zabrc, B., Radojcic, M.B., 2007. Adjuvant antiproliferative and cytotoxic effect of aloin in irradiated HeLaS3 cells. Biophys Chem; 81: 1463-1466.

Nickavar, B., Mojab, F., & Dolat-Abadi, R. 2005. Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. Food chem; 90: 609- 611.

Nostro, A., Papalia, T. 2012. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. Recent Pat Antiinfect Drug Discov; 7: 28–35.

O

Oussala, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. Meat Sci; 73: 236-244.

Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Jpn J Nutr; 44:307-315.

Özcan, M., Chalchat, J.C. 2004. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey- Bulg. J. Plant Physiol; 30(3-4): 68-73.

Ozcelik, B., Lee, J.H., Min, D.B. 2003, Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. J Food Sci; 68: 487-490.

P

Paris R., Godon M. 1979. Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.

Pei, R.S.; Zhou, F.; Ji, B.P.; Xu, J. 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. J. Food Sci; 7: 379–383.

Pharmacopée Européenne, 1997, 3ème édition, Conseil de l'Europe. Sainte Ruffine : éd. Maisonneuve S.A, 1918 pages.

Pinto, E., PinaVaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M.J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A., Martinez-de-Oliveira, J. 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on candida, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol* ; 55: 1367-1373.

Pousset J.L. 1989. Plantes médicinales africaines, ACCT, Paris, Tome 1, 156 p.

Q

Quezel, P., Santa, S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 1170p.

R

Raeissi, S., & Peters, C. J. 2005, Liquid–vapor and liquid–liquid–vapor equilibria in the ternary system ethane+limonene+linalool. *Journal of Supercritical Fluids*, 33, 201–208.

Rahman, S., Ansari, R. A., Rehman, H., Parvez, S., & Raisuddin, S. 2011. Nordihydroguaiaretic acid from Creosote bush (*Larrea tridentata*) mitigates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammatory and oxidative stress responses of tumor promotion cascade in mouse skin. *J Evid Based Complementary Altern Med*. Article ID: 734785, 10.

Rasband, W. 2008, ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda MD, USA. imagej.nih.gov/ij/

Rasooli, I., Abyaneh, M. R. 2004. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*; 15(6): 479-483.

Rasooli, I., Mirmostafa, S.A. 2002. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia*; 73: 244-250.

Reyes, J.E., Guanoquiza, M.I., Gipsy, T.M., V-Galvez, A., 2012. Microbiological stabilization of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel by high hydrostatic pressure treatment. *Int J Food Microbiol*; 158: 218-224.

Reynolds, T. 2004. Aloes the genus *Aloe*. Medicinal and Aromatic Plants. Industrial Profiles. CRC Press LLC.374 p.

Reynolds, T., Dweck, A. 1999. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *J. Ethnopharmacol*; 68: 3-37.

Richard, H., Benjilali, B., Baouquour, N., Baritiaux, O. 1985. Etude de diverses huiles essentielles de thym du Maroc. *Lebensm- Wiss U-Technol*.

Rota, M.C., Herrera, A., Martinez, R.M., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*; 19: 681-687.

Sahraoui N., Abchiche H., Mellal M. 2016. Optimisation par plan d'expériences de l'extraction de l'huile essentielle du (*Thymus palleescens*). International Journal of Scientific Research & Engineering Technology. IJSET; 85-93.

Sahraoui, N., Abert Vian, M., El Maataoui, M., Chemat, F. 2011. Valorization of citrus by-products using microwave steam distillation (MSD)". Innov. Food Sci. Emerg. Technol; 2: 163-170.

Sahraoui, N., Vian, M.A., Bornard, I., Boutekedjiret, C., Chemat F. 2008. Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils. Comparison with conventional steam distillation. J Chromatogr A;1210(2): 229-33.

Saidj, F. 2006. Extraction de l'huile essentielle de thym: *Thymus numidicus kabylica*-Mémoire de Magister en Technologie des hydrocarbures, Département Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques; Université M'Hamed Bougara – Boumerdes Algérie .

Sannomiya, M., Fonesca, V. B., Silva, M. A., Rocha, L. R. M., Santos, L. C., Hiruma-Lima, C. A., Vilegas, W. 2005. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Bysonima crassa* leaves extracts. J Ethnopharmacol; 130: 334–339.

Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., Van de Wetering, M., Barker, N., & Stange, D. E. 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature; 459: 262–265.

Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Fougrach, H., Bourkhiss, B., Talbi, M.B. 2007, Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux; 146 : 85-96.

Shabnum, S., & Wagay, M.G. 2011. Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. J. Res. Develop; 11: 83-90.

Shahi, A.K., Chandras, S., Dutt, P., Kaul, B.L., Tava, A., Avato, P. 1999, Essential oil Composition of *Mentha piperita* of north India. Flavour Fragr. J; 14: 5-8.

Shetty, B.S., Udupa, S.L., Udupa, A.L. 2008. Biochemical analysis of granulation tissue in steroid and *Centella asiatica* (Linn) treated rats. Pharmacology online; 2: 624-632.

Shimizu, S. 1973. Chemistry and Biology of Mentha (in Japanese).Chem.and Bio; 13: 659-666.

Sidahmed, H.M., Hashim, N.M., Abdulla, M.A., Ali, H.M., Mohan, S., Abdelwahab, S.I., Taha, M.M., Fai, L.M., Vadivelu, J. 2015. Antisecretory, gastroprotective, antioxidant and anti-helicobacter pylori activity of zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. Plos One, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121060>.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. 2003. Principe d'analyse instrumentale. Ed. De Boeck universite, Paris, 956p.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol*; 18: 463-70.

Soliman, K.M., Badeaa, R.I. 2002. Effet of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food chem Toxicol*; 40: 1669-1675.

Stone, N., MEISTAR, A., 1965. Function of ascorbic in the conversion of proline to collagen hydroxyproline. *Nature*; 194: 555-57.

Sugiura, S., Nakajima, M. & Seki, M. J Amer. 2002. Preparation of monodispersed emulsion with large droplets using microchannel emulsification. *Oil Chem Soc*; 79: 515.

Sutour, S. 2010. Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats. Thèse de Doctorat en Science, discipline Chimie. Université de Corse.

T

Takayama, C., De-Faria, F. M., De-Almeida, A. C., Rehen, C. S., & Dunder, R. J. 2011. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol*; 135(1): 147–155.

Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. 2005. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *Rosulans*. *J Food Eng*; 66: 447-454.

Tomi, F & Casanova, J. 2006. ¹³C NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from *Labiatae* - a review. *Acta Horti*; 723: 185-192.

Tranchant, J., Arpinaud, P, Prevote, A., Serpinet, J., Vergnol, A., Witier, P. 1995. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4^{ème} édition, Ed. Masson, 700p.

Tyagi, A.K., Malik, A. 2010. Liquid and vapor-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complement Alternat Med*; 10: 65.

U

Ultee, A., Bennik, M.H., Moezelaar, R. 2002, The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*; 68: 1561-1568.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J. 1999, Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*; 65(10): 4606-10.

V

Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Med Rev*; 56(3): 395-411.

Vane, J. R. 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol*; 5: 231–232.

Vialo, A. 1998. *Elément de toxicologie. Technique et documentation*, Lavoisier, Paris.

W

Walsh, S.E., Maillard, J.Y., Russell, A.D. 2003. Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect*; 55: 98-107.

Wang, X., Lan, M., & Wu, H. P. 2002. Direct effect of croton oil on intestinal epithelial cells and colonic smooth muscle cells. *World J Gastroenterol*; 8(1): 103–107.

Ward, P.A & Till, G.O. 1990. Pathophysiologic events related to thermal injury of skin. *J Trauma*; 30(12): S75-9.

Wilkinson, L.J., White, R.J., Chipman, J.K., 2011. Silver and nanoparticles of silver in wound dressings: A review of efficacy and safety. *Wound Care*; 20: 543-549.

Winter, C. A., Risley, E. A., & Nuss, G. W. 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 111; 544–547.

Y

Young, J. M., & de Young, L. M. 1989. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents in *Pharmacological methods in the control of inflammation*. In Chang, J. Y., & Lewis, A. J. (Eds.), New York: Alan R. Liss Inc 215–231.

De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.J., Young, J.M. 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*; 26(3-4):335-41.

Z

Zaika, L. 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Saf* ; 9(2): 97-118.

Zapata, P.J., Navarro, D., Guilléna, F., Castillo, S., M-Romero, D., Valero, D., Serrano, M., 2013. Characterisation of gels from different *Aloe* spp. as antifungal treatment: Potential crops for industrial applications. *Ind Crops Prod*; 42: 223- 230.

REFERENCES PERSONNELLES

Mahdi, Y., Mouhi, L., Guemras, N., Daoud, K., 2016. Coupling the image analysis and the artificial neural networks to predict a mixing time of a pharmaceutical powder. *J. Fundam. Appl. Sci.* 8(3), 655-670.

Mouhi, L., Moghrani, H., Nasrallah, N., Amrane, A., Maachi, R. 2016. Anti-inflammatory activity of essential oil of an endemic *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. with chemotype

carvacrol, and its healing capacity on gastric lesions. J Food Biochem. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12359>.

Mouhi, L., Moghrani, H., Nasrallah, N. Evaluation de l'activité Antipyrétique de l'HE de *Thymus fontanesii*. 2^{ème} Congrès International de la Société Algérienne de Nutrition. Alger le 14 et 15 octobre 2015.

Mouhi, L., Moghrani, H., Ragui, K., Maachi, R. Application de modèles cinétique à l'extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*. Journées internationales de cinétique, catalyse et calorimétrie JIC. Alger, les 02-04 Mai 2015.

WEBOGRAPHIE

Burger, W. and Burge, M.J. 2008. Digital Image Processing, Springer Verlag. www.imagingbook.com/

Pibiri, M.C. 2006, Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. PhD thesis. Lausanne, Suisse: Federal Polytechnic Institute, <http://dx.doi.org/10.5075/epfl-thesis-3311>.

Annexes

ANNEXE N°1

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

Densité à 20°C

- **Définition**

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

- **Calcul**

Densité relative à température ambiante :

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

Avec;

m_{PV} représente la masse de pycnomètre vide

Densité relative à 20°C :

$$d_{20} = d_{TA} / 0.9982 (0.0007 \{t_A - 20\}).$$

Où:

0.9982 g/ml est la masse volumique de l'eau à 20°C

0.0007 est un facteur correctif

t_A : température ambiante

d_{TA} : densité à température ambiante

Indice de réfraction à 20°C

Définition

Rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante. La longueur d'onde spécifiée est (589.3 + 0.3) nm, correspondant aux radiations D1 et D2 du sodium. = + 0.0004(t'- t) : valeur lue, à la température t', à laquelle a été effectuée la détermination. t : température de référence.

Calcul

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

$$nD^t = nD^{t'} + 0.0004 \times (t' - t)$$

Où la température de référence est de 20°C

Avec:

$nD^{t'}$ est la valeur de lecture

t représente la température de l'huile essentielle.

ANNEXE N°2

Protocole expérimental suivi lors de l'évaluation qualitative et quantitative de l'activité antimicrobienne

a) Protocole expérimental suivi pour l'évaluation qualitative

- **Préparation de la première couche de milieu**

On fait fondre les milieux Mueller-Hinton et Sabouraud dans un bain marie à 95°C, après on verse aseptiquement une première couche des deux milieux dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte, on laisse refroidir et solidifier sur paillasse.

- **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture jeune de 18 à 24h pour les bactéries et de 48h pour les levures, on réalise des suspensions troubles en prélevant 3 à 4 colonies bien isolées et identiques, qu'on dépose dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex. On réalise une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre en estimant la transmittance qui doit être comprise entre 22 et 32% pour les bactéries et entre 2 et 3% pour les levures et cela à une longueur d'onde de 620 nm.

Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus correspondent à une concentration optimale de 10^7 - 10^8 germes/ml. Si une des valeurs trouvée à la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle, on l'ajuste soit en ajoutant de l'eau physiologique (à 9% de NaCl) si elle est inférieure à la valeur minimale ou en ajoutant des colonies si elle est supérieure à la valeur maximale. A chaque fois une nouvelle lecture de transmittance est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées. L'inoculum doit être utilisé dans les 15mn suivant sa préparation.

- **Préparation de la deuxième couche du milieu**

On fait fondre les deux milieux MH et SAB, on les laisse refroidir jusqu'à une température de 45°C et on transvase 50 ml de chaque milieu dans des flacons stériles. On ensemence les milieux avec 200 µl de chaque suspension et on agite manuellement; puis on dépose rapidement 4 ml de chaque milieu ensemencé sur la surface de la première couche (couche support) de gélose solidifiée. On étale immédiatement la couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme et on laisse solidifier sur la paillasse

b) Protocole expérimental suivi pour l'évaluation qualitative

- **Dénombrement des germes**

Réaliser des cultures bactériennes, dans le milieu solides TSA pour les bactéries et SAB pour les levures et incubé à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures.

Réaliser des suspensions bactériennes et de levures pour avoir une concentration de 10^8 germes/ml

Effectuer une série de dilutions allant jusqu'à 10^{-4} , en prélevant 1ml de la suspension mère qu'on verse dans 9ml d'eau distillée stérile, ceci nous donne la dilution 10^{-1} . On procède de la même façon pour obtenir les autres dilutions (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}).

- **Dilution de l'huile essentielle et de l'extrait dans les milieux de cultures**

Liquéfaction de 200ml des milieux TSA et SAB à 95°C dans un bain marie, en additionnant 1ml de Tween 80 pour une meilleure solubilité.

Réaliser une série de dilution de l'huile essentielle mélangée ainsi que l'HE de Thym allant de 2% jusqu'à 0.03% dans les milieux et cela en prélevant 1ml d'HE qu'on dépose dans 50ml de milieu dans un premier flacon, ce qui donne la dilution de 2% ((2ml d'HE dans 100ml du milieu) puis verser la moitié du flacon dans un deuxième et ajuster avec 25ml de milieu ce qui correspond à la dilution 1% et on procède de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0.03%

Au fur et à mesure de la réalisation des dilutions, la moitié du flacon de chaque dilution est coulée dans une boîte de pétri que nous laissons refroidir et gélifier.

ANNEXE N°3

Tableau 1. Diamètres des zones d'inhibition de l'HE de l'écorce de *C. sinesis* seule et en combinaison avec l'HE de *T. fontanesii*.

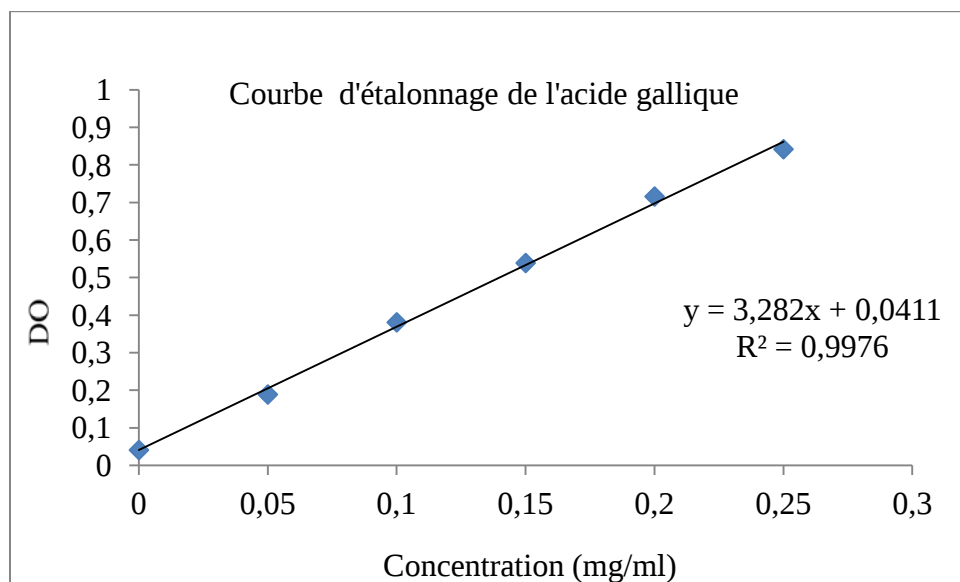
Souche	Diamètre des zones d'inhibition DZI (mm)								
Volume en HE (µl/disc)	HE de <i>C. sinesis</i>			Combinaison			HE de <i>T. fontanesii</i>		
	HE <i>T. fontanesii</i> / HE <i>C. sinesis</i>								
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
<i>C. albicans</i>	6	6	6	17.80	19.20	28.54	54	62	68
<i>Ps. Aeruginosa</i>	6	6	6	8.06	8.23	9.09	7	7	7

Tableau 2. Diamètres des zones d'inhibition de l'HE de *M. piperita* seule et en combinaison avec l'HE de *T. fontanesii*.

Souche	Diamètre des zones d'inhibition DZI (mm)								
Volume en HE (µl/disc)	HE M. piperita			Combinaison			HE T. fontanesii		
	HE T. fontanesii/ HE M. piperita								
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
C. albicans	6	6	6	17	23	25	54	62	68
E. coli	6	6	11	15	20	22	22	22	22
B. subtilis	6	6	6	22	24	26	45	45	47
S. aureus	8	9	9	24	26	28	37	41	56

ANNEXE N°4

Courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard



ANNEXE N°5

Composition et procédé de fabrication des émulsions

La formulation proposée vise à améliorer l'élasticité de la peau et de la protéger contre les agressions extérieures.

Nous avons utilisé des matières actives, ce sont des composants qui améliorent l'indice d'hydratation de la peau tels que (glycérine) à cela s'ajoutent des extraits d'huiles essentielles propriétés revitalisantes (aloès arborescence et thym) ces derniers présentes une complémentarité et une synergie.

	Fonction	Référence bibliographique
Polysorbate 60	solubilisant	Pharmacopée Européenne 2011 7 ^{ème} édition
Propylène glycol	Solvant / véhicule huileux	Pharmacopée Européenne 2011 7 ^{ème} édition
Glycérol	Anti bactérien	Pharmacopée Européenne 2011 7 ^{ème} édition
Alcool cétyloléique	consistance	Pharmacopée Européenne 2011 7 ^{ème} édition
Laurylsulfate de sodium	Emulsifiant	Pharmacopée Européenne 2011 7 ^{ème} édition
Huile essentielle de thym	Actif (utilisé comme principe actif)	
Extraits d'aloès vera	Actif (utilisé comme principe actif)	
Eau purifiée	Solvant / véhicule aqueux	Pharmacopée Européenne 2011 7 ^{ème} édition

• Procédé de fabrication à l'échelle laboratoire

Etape 1 : propreté du matériel et pesé des matières

Etape 2 : **Préparation de la Phase aqueuse :**

Dans un bêcher de capacité 250 ml contenant l'eau purifiée et sous agitation de 40 trs/ mn et a une température de 65 °c introduire le polysorbate 60 le mélange se fait pendant 15 minutes.

Etape 3 : **Préparation de la phase huileuse :**

Dans un bêcher de capacité 250 ml introduire sous agitation de 40 tours/mn et à une température de 40 °c le propylène glycol et le glycérol le mélange se fait pendant 5 minutes. Puis augmenter la température à 55 °c avec une agitation de 40 tours/mn, introduire l'Alcool cétyloléique

Après dissolution complète augmenter la température à 65 °c

Etape 4 : **Préparation de l'émulsion**

Sous une agitation de 80 trs/mn et à une température de 65 °c introduire la phase huileuse dans la phase aqueuse puis diminuer la température à 55 °c et introduire l'homogénéisateur pendant 15 secondes (cette opération peut être supprimée par manque de moyen matériel), puis maintenir le mélange à 40 trs/ mn pendant 20 minutes.

Etape 5 : **Incorporation des actifs revitalisants**

Sous une agitation de 40 trs/mn et à une température de 55 °c introduire :

Huile essentielle de thym

Extraits d'aloès arborescence

Le mélange est maintenu jusqu'à refroidissement de la crème.

Abstract

In the goal of the valorization of Algerian flora, we realized a study on the therapeutic benefits of combinations of essential oils and extract of various plants. The essential oil considered is that of an aromatic plant, *Thymus fontanesii*, belonging to the Labiate family and native of Algeria.

The characterization of the essential oil of this species of thyme harvested in the mountains of Medea (Algeria) revealed a major compound, Carvacrol (66.3%). The evaluation of several biological and pharmacological activities of this essential oil has revealed remarkable therapeutic properties explaining the persistence of its traditional use.

To evaluate the therapeutic benefits of combinations of essential oils and plant extracts, we first performed an evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii* alone, as well as in association with the essential oils of Peppermint (*Mentha piperita*) and Orange (*Citrus sinensis*).

Secondly, the evaluation of the healing activity of a formulation with essential oil of *Thymus fontanesii* alone and that in association with the *Aloe arborescens* gel has been developed.

The results showed that the essential oil of *Thymus fontanesii* improved the antimicrobial power of the two other essential oils and that the formulation tested on the wound healing containing the two associated extracts exhibits a wider spectrum of action than that of each extract used alone.

Key words: *Thymus fontanesii*, essential oils, Carvacrol, Combinations of extracts, miscibility, image analysis, antimicrobial activity, wound healing activity.

جامعة هواري بومدين للعلوم و التكنولوجيا
ليلية موحى

ملخص

في سياق تقييم النباتات الجزائرية، أجرينا دراسة عن الفوائد العلاجية لمزج الزيوت العطرية ومقتطفات من مختلف النباتات. يعتبر الزيت الأساسي لنبات عطري الزعتر (*Thymus fontanesii*) التي تنتمي إلى عائلة لابيت والتي أصلها من الجزائر وتونس أساس هذه الدراسة.

كشفت توصيف الزيوت الأساسية لهذا النوع من الزعتر التي جمعت في جبال المدية (الجزائر) عن عنصر مهمين، كارفاكرو (66.3%). وقد كشف تقييم العديد من الأنشطة البيولوجية والدوائية من هذا الزيت العطري خصائص علاجية ملحوظة تشرح استمرار استخدامه التقليدي.

لتقييم الفوائد العلاجية لمزج الزيوت العطرية ومقتطفات من مختلف النباتات، قمنا أولاً بإجراء تقييم للنشاط المضاد للميكروبات من الزيوت الأساسية من الزعتر (*Thymus fontanesii*) وحدها، وكذلك بالاشتراك مع الزيوت الأساسية من النعناع (*Mentha piperita*) و البرتقال (*Citrus sinensis*).

ثانياً، قمنا بتقييم صياغة متكونة من الزيوت الأساسية من الزعتر وحدها، وبالتعاون مع هلام من الصبار على شفاء الندب. وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الزيوت الأساسية من الزعتر قامت بتحسين قوة مضادات الميكروبات من الزيوت الأساسية الأخرى، وأن صياغة الزيوت الأساسية من الزعتر مع مستخرج الصبار قدم نتائج أفضل و مرضية من أن تستخدم مقتطفات لوحدها

الكلمات الرئيسية: الزعتر، الزيوت العطرية، كارفاكرو، مزج مستخلصات النباتات ، امتزاج، تحليل الصور، فعالية مضادات الميكروبات، فعالية شفاء الندب.