

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene
Faculté de Chimie



THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT

EN : CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique Appliquée

Par : **M. HAZZIT Mohamed**

SUJET

**Etude de la composition chimique
des huiles essentielles
de différentes espèces de thym
et d'origan poussant en Algérie**

Soutenue publiquement le : 08 /03/2008, devant le jury composé de :

Mr. A. TOUABET	Professeur à l'USTHB	Président
Mr. A. BAALIOUAMER	Professeur à l'USTHB	Directeur de Thèse
Mme F. AID	Professeur à l'USTHB	Examineur
Mr. H. AIT-AMAR	Professeur à l'USTHB	Examineur
Mr. C. CHELGHOUM	Professeur à l'USTHB	Examineur
Melle C. BOUTEKDJIRET	Professeur à l'E.N. P	Examineur
Mr. E.H. BENYOUSSEF	Professeur à l'E.N. P	Examineur

Remerciements

Le présent travail rentre dans le projet associé au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) et intitulé « Extraction et analyses fines d'huiles essentielles Algériennes : cas des essences d'eucalyptus, de cèdre, d'armoise, de nigelle, de thym et d'origan ».

Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

J'ai eu la chance de réaliser ce travail de recherche dans divers laboratoires : celui de Chimie de l'Institut National Agronomique (INA), celui de l'Analyse Organique Fonctionnelle de la Faculté de Chimie (USTHB) ainsi que ceux de la Valorisation des Produits Végétaux et de Microbiologie de la Faculté des Ingénieurs en Exploitation des Ressources Naturelles (Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais- FERN) de l'Université de Faro au Portugal, sous la direction respective de Monsieur le Professeur Aoumeur Baaliouamer et Madame le Professeur Maria Da Graça Costa Miguel.

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

Je veux exprimer ici ma vive reconnaissance à Madame le professeur Maria Da Graça Costa Miguel pour son dévouement incomparable, son encadrement sans faille et pour ses nombreux avis éclairés durant nos entrevues. Je la remercie vivement pour sa collaboration, sa disponibilité permanente et pour m'avoir initié dans les analyses des activités antioxydante et antimicrobienne. Sa grande expérience, sa gentillesse et ses grandes qualités scientifiques et humaines ont été d'un apport considérable dans mon travail. Je la remercie, ainsi que son aimable mari. Je regrette amèrement leur absence due à leur calendrier très chargé.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur le Professeur A. Touabet en acceptant de présider le jury de ce travail. Je le remercie vivement pour cette marque d'intérêt.

Je suis très sensible aussi à l'honneur que me font Mesdames les Professeurs F. Aid et C. Boutekdjiret et Monsieur le Professeur Benyoussef, en acceptant de participer à ce jury.

Je ne remercierais jamais assez Monsieur le Professeur H. Ait-amar, non seulement pour l'honneur qu'il me fait en participant à ce jury mais aussi pour m'avoir tendu la main à un moment difficile de ma carrière en acceptant

d'encadrer mon mémoire de Magister. Si je suis arrivé au point où je suis, c'est en grande partie grâce à son aide opportune et désintéressée.

Mes plus vifs remerciements vont aussi à Monsieur le Professeur C. Chelghoum pour l'honneur qu'il me fait pour la deuxième fois en acceptant d'examiner ce travail après celui de mon mémoire de Magister. Je le remercie vivement pour m'avoir conseillé et orienté dans la bonne direction au moment où j'étais à la recherche d'un directeur de thèse.

L'identification et l'authentification des espèces de thym et d'origan ont été réalisées par Feu Abdelkader Beloued, que la miséricorde de Dieu soit sur lui.

A Monsieur Sbabdji Mohamed, homme de terrain et responsable au niveau du Parc National de Chréa, une vive reconnaissance pour son assistance précieuse dans la localisation et la récolte de plantes et sa disponibilité à mon égard.

Les couplages CG/MS ont été effectués au CRAPC. Je tiens à remercier tous ses ingénieurs et ses responsables avec à leur tête Mr le Professeur B.Y. Meklati.

Les coupes histologiques ont été réalisées au laboratoire de biologie végétale du département de botanique de l'INA. Je remercie Mme Fatima-Zohra pour son aide dans la réalisation des coupes anatomiques.

Que tous ceux qui se sont penchés un tant soit peu sur ce travail trouvent ici mon message de profonde sympathie et gratitude.

Je ne saurais terminer ce message sans remercier les nombreuses personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la collecte des différentes espèces et particulièrement Messieurs Amirouche Chikhouné, Boualem Harfi, kamel Aggoune, Amar Kessi, Salim Fadli, Abderezzak de Kadiria, Rachid de Tablat et Melle Kheira de Djelfa ainsi que son père et son frère.

Abréviations

ABAP : 2,2'-azobis(2-aminodipropane) dihydrochloride

ABTS : 2,2- azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)

Acetyl-CoA: acetyl-Coenzyme A

ATP : Adinosine triphosphate

BHA : butyl-hydroxy-anisole

BHT : butyl-hydroxy-toluène ou hydroxytoluene butylated

CCM : chromatographie sur couche mince

CLC : chromatographie liquide sur colonne ouverte

CLHP : chromatographie liquide à haute performance

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CPG : chromatographie en phase gazeuse

CPGP : chromatographie en phase gazeuse préparative

DL₅₀ : Dose létale

DMAPP : diméthylallyldiphosphate

DMPD : *N, N*, -dimethyl-p-phenylenediamine

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ERO : espèces réactives de l'oxygène

Et : éthyle

g : gramme

GPP : géranyl pyrophosphate

HMG-CoA : hydroxymethylglutaryl-CoA

I(%) : Pourcentage d'inhibition ou activité antioxydante

IC : Ionisation chimique

IC₅₀ : concentration inhibitrice de 50% des radicaux

ICN : Ionisation chimique négative

ICP : Ionisation chimique positive

IE : Impact électronique

IK : Indice de rétention

IPP : Isopentenyl diphosphate

IRTF : Infra-Rouge par Transformée de Fourier

L : Litre

MVA : Acide mévalonique

MVA-PP : Mévalonate diphosphate

NDGA : acide norhydroguaiariétique

O. : *Origanum*

p : Poids en grammes

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SDS : Sodium dodecyl sulphate

SM : Spectrométrie de masse

T. : *Thymus*

TBA : Acide thiobarbiturique

TBARS : Thiobarbiturique acide reactive substances (Substances réactives au TBA : **srTBA**)

TBHP : Trihydroxybutyrophénone

TBHQ : Ter-Butyl-hydroxy-quinone

V : Volume (mL)

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales familles botaniques et organes sécréteurs des huiles essentielles.....	6
Tableau 2 : Principales localisations géographiques du thym en Algérie.....	19
Tableau 3 : Exemples de chémotypes rencontrés dans les huiles essentielles du thym.....	23
Tableau 4 : Répartition géographique des deux espèces d'origan en Algérie.....	30
Tableau 5 : Espèces de thym et d'origan étudiées.....	60
Tableau 6 : Souches microbiennes testées par les huiles essentielles de <i>T. pallescens</i> de Boussaâda, de <i>T. dreatensis</i> , de <i>T. munbyanus</i> et d' <i>Origanum floribundum</i> de Chréa.....	74
Tableau 7 : Souches microbiennes testées par les huiles essentielles de <i>T. pallescens</i> de Tablat, de <i>T. munbyanus</i> , de <i>T. numidicus</i> , de <i>T. guyonii</i> et d' <i>Origanum floribundum</i> de Chréa et de Hammam Mélouane et d' <i>O. glandulosum</i> d'Ighzer Amokrane, de Souhane et d'Ouled Slama.....	74
Tableau 8 : Rendements (mL/100g) des extractions à partir de la matière fraîche de différentes espèces de thym et d'origan.....	79
Tableau 9 : Rendements en huiles essentielles (%) d' <i>O. glandulosum</i> cités dans la littérature.....	80
Tableau 10 : Rendements en huiles essentielles (mL/100g de matière sèche) de <i>T. pallescens</i> à différentes périodes du cycle végétatif en 4 années successives.....	80
Tableau 11 : Rendements en huiles essentielles des feuilles et des fleurs (mL/100g de matière fraîche) de <i>T. pallescens</i> et d' <i>O. floribundum</i> de Kadiria.....	80
Tableau 12 : Densité relative à 20°C, couleur et indice de réfraction à 20°C de quelques espèces de thym et d'origan.....	83
Tableau 13 : Caractéristiques physiques et organoleptiques de <i>Thymus zygis</i> et <i>Thymus mastichina</i> selon AFNOR (2000).....	83
Tableau 14 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons d' <i>Origanum floribundum</i>	85
Tableau 15 : Comparaison entre les teneurs (%) des composés majoritaires des huiles essentielles d' <i>Origanum floribundum</i>	87
Tableau 16 : Composition (%) des huiles essentielles des feuilles et des fleurs d' <i>Origanum floribundum</i> de Kadiria.....	88
Tableau 17 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons d' <i>Origanum glandulosum</i>	90
Tableau 18 : Comparaison des teneurs (%) des composés majoritaires des huiles essentielles d' <i>Origanum glandulosum</i> Desf.	93
Tableau 19 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons de <i>Thymus algeriensis</i>	96
Tableau 20 : Principaux composés (%) identifiés dans les 4 échantillons de <i>Thymus algeriensis</i>	100
Tableau 21 : Principaux composés (%) de <i>Thymus algeriensis</i> d'Afrique du nord rapportés dans la littérature.....	101
Tableau 22 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons de <i>Thymus numidicus</i>	104
Tableau 23 : Principaux composés des huiles essentielles de <i>T. numidicus</i> d'Algérie.....	106
Tableau 24 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons de <i>T. dreatensis</i> , <i>T. munbyanus</i> et <i>T. guyonii</i>	108
Tableau 25 : Principaux composés des espèces <i>T. munbyanus</i> , <i>T. dreatensis</i> et <i>T. guyonii</i>	112

Tableau 26 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons de <i>T. pallescens</i> de différentes régions.....	113
Tableau 27 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons de <i>T. pallescens</i> à trois périodes du cycle végétatif pendant quatre années successives (2003-2006).....	117
Tableau 28 : Composition (%) des huiles essentielles de <i>Thymus pallescens</i> extraites à partir des feuilles et des fleurs	124
Tableau 29 : Effet du mode de séchage sur la composition des huiles essentielles de <i>Thymus pallescens</i> de Tablat.....	127
Tableau 30 : Teneur en mg/Kg des principaux composés de <i>Thymus vulgaris</i> L. séché à l'air chaud (30°C) et à froid.....	129
Tableau 31 : Compositions chimiques (%) des différentes fractions de <i>Thymus pallescens</i> au cours de l'extraction.....	130
Tableau 32 : Composition (%) des deux fractions <i>T. pallescens</i> de Boussaada issues de la distillation	133
Tableau 33 : Composition (%) de l'huile essentielle de <i>T. pallescens</i> de Boussaâda exposée à la lumière.....	135
Tableau 34 : Variation des principaux composés et classes de composés (%) en fonction de la durée d'exposition à la lumière.....	136
Tableau 35 : Activité de piégeage du radical DPPH par le BHA, BHT et les huiles essentielles de l'origan....	138
Tableau 36 : Activité de piégeage du radical DPPH par le BHA, le BHT et les huiles essentielles de <i>T. munbyanus</i> , <i>T. pallescens</i> , <i>T. numidicus</i> et <i>T. Guyonii</i>	139
Tableau 37 : Activité de piégeage (%) du radical DPPH par le BHA, le BHT et les huiles essentielles de <i>T. dreatensis</i> , <i>T. algeriensis</i> et <i>T. pallescens</i> de différentes régions.....	140
Tableau 38 : Activité antioxydante (%) du BHT, BHA, tocopherol et des huiles essentielles de l'origan à différentes concentrations (mg/L) en utilisant le test TBARS en l'absence de l'initiateur de radicaux ABAP.....	143
Tableau 39 : Activité antioxydante (%) du BHT, BHA, tocopherol et des huiles essentielles de l'origan à différentes concentrations (mg/L) en utilisant le test TBARS en présence de l'initiateur de radicaux ABAP.....	143
Tableau 40 : Activité antioxydante (%) des huiles essentielles d' <i>Origanum glandulosum</i> de différentes localités de la région de Sétif à différentes concentrations (mg/L) en utilisant le test TBARS en présence de l'initiateur de radicaux ABAP.....	144
Tableau 41 : IC ₅₀ (µg/ml) du BHT, des huiles essentielles de <i>T. algeriensis</i> , <i>T. pallescens</i> de différentes régions et de <i>T. dreatensis</i> dans le test d'inhibition de la peroxydation lipidique par la réaction au TBA (TBARS).....	146
Tableau 42 : Valeurs des IC ₅₀ (µg/ml) du mannitol et des huiles essentielles des échantillons d' <i>O. floribundum</i> et d' <i>O. glandulosum</i> dans le test de l'inhibition du radical hydroxyle.....	149
Tableau 43 : Valeurs des IC ₅₀ (µg/ml) du mannitol et des huiles essentielles des échantillons du thym dans le test de l'inhibition du radical hydroxyle.....	150

Tableau 44 : Zones d'inhibition (mm±SD ; diamètre du disque=6mm, inclus).....	155
Tableau 45 : Activité antilisteriale des huiles essentielles de <i>Thymus</i> (<i>munbyanus</i> , <i>pallescens</i> de Tablat, <i>numidicus</i> et <i>guyonii</i>) et d'origan (mm, diamètre du disque = 6mm, inclus).....	158
Tableau 46 : Tableau récapitulatif des principales analyses effectuées.....	159

Liste des figures

Figure 1 : Les méthodes d'analyse d'un mélange complexe.....	10
Figure 2 : Identification des composés d'une huile essentielle par CPG/IK et CPG/SM.....	13
Figure 3 : Répartition géographique du thym dans le monde.....	18
Figure 4 : Composés des huiles essentielles du genre <i>Thymus</i> dans l'ordre de leur importance.....	22
Figure 5 : Anatomie d'un trichome glandulaire de thym (<i>Thymus vulgaris</i>).....	23
Figure 6 : Biosynthèse des terpénoïdes. A gauche : voie classique (Voie acétate/mévalonate) ; à droite la voie pyruvate/glyceraldéhyde 3-phosphate.....	25
Figure 7 : Biosynthèse des principaux monoterpènes dans <i>T. vulgaris</i>	26
Figure 8 : Biosynthèse du thymol et du carvacrol.....	27
Figure 9 : Répartition géographique de l'origan dans le monde.....	29
Figure 10 : Nombre de taxons poussant dans les différents pays méditerranéens.....	29
Figure 11 : Oxydation d'un acide gras insaturé.....	33
Figure 12 : Suite des réactions en chaîne conduisant à la détérioration organoleptique des acides gras insaturés.....	35
Figure 13 : Mécanisme d'initiation de la peroxydase des lipides par l'activité lipoxygénasique.....	36
Figure 14 : Stabilisation d'un radical libre d'acide gras par un composé phénolique.....	39
Figure 15 : Acide ascorbique.....	39
Figure 16 : Structure de l' α -tocophérol.....	40
Figure 17 : Composés phénoliques à activité antioxydante dans certaines épices.....	40
Figure 18 : Composés phénoliques extraits du thym et de l'origan, du romarin et de la sauge.....	31
Figure 19 : Antioxydants de la famille des caroténoïdes (β -carotène) et de la famille des polyphénols (acide caféique et quercétine).....	42
Figure 20 : Principaux antioxydants de synthèse utilisés dans l'industrie agroalimentaire.....	43
Figure 21 : Tests de mesure de l'activité antioxydante.....	46
Figure 22 : Formule chimique du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH [•]).....	49
Figure 23 : Structure chimique de l'ABTS et du radical cation correspondant.....	50
Figure 24 : Formule chimique du <i>N, N</i> , -diméthyl- <i>p</i> -phénylènediamine (DMPD).....	50
Figure 25 : Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri.....	57
Figure 26 : Illustration de la méthode des microatmosphères.....	58
Figure 27 : <i>Thymus Munbyanus</i>	61
Figure 28 : Schéma de calice et de fleur de <i>Thymus munbyanus</i>	61
Figure 29 : <i>Thymus palleescens</i> (Tablat) en période de feuillaison.....	62
Figure 30 : Inflorescences de <i>T. palleescens</i>	62
Figure 31 : Calice d'une fleur.....	62
Figure 32 : Feuille de <i>Thymus dréatensis</i>	62
Figure 33 : <i>Thymus dréatensis</i> (Inflorescences).....	62
Figure 34 : <i>T. algeriensis</i>	63
Figure 35 : <i>T. numidicus</i> (période de feuillaison)	63
Figure 36 : Feuilles de <i>T. numidicus</i> et de <i>T. guyonii</i> (feuille sèche).....	63

Figure 37 : Inflorescences (<i>T. numidicus</i>).....	63
Figure 38 : <i>Thymus Guyonii</i> de Noé (Djebel Haoues, Djelfa).....	64
Figure 39 : <i>O. glandulosum</i> (Période de feuillaison).....	64
Figure 40 : <i>O. glandulosum</i> en période de floraison.....	64
Figure 41 : <i>O. floribundum</i>	65
Figure 42 : Inflorescences d' <i>O. floribundum</i>	65
Figure 43 : Schéma simplifié du principe de la méthode des aromatogrammes.....	73
Figure 44 : Coupe transversale de la tige de <i>T. dréatensis</i>	77
Figure 45 : Coupe transversale de la feuille de <i>T. munbyanus</i>	77
Figure 46 : Tige de <i>T. pallescens</i>	77
Figure 47 : Feuille <i>T. pallescens</i>	77
Figure 48 : Tige d' <i>origanum floribundum</i>	78
Figure 49 : Schéma des poils sécréteurs et tecteurs.....	78
Figure 50 : Coupe transversale d'une feuille d'origan observée au microscope photonique mettant en évidence la présence de poils glandulaires.....	78
Figure 51 : Schéma d'un poil glandulaire	78
Figure 52 : Coupe d'une feuille d' <i>Origanum glandulosum</i> avec des poils sécréteurs et un poil tecteur	78
Figure 53 : Photo agrandie d'une partie d'une feuille de <i>Thymus numidicus</i> sur laquelle on peut voir des glandes sphériques ou sous forme de points.....	78
Figure 54 : Cinétique d'extraction de l'huile essentielle de <i>T. palle cens</i> de Boussaâda.....	81
Figure 55 : Cinétique d'extraction de l'huile essentielle de <i>T. pallescens</i> de Tablat.....	82
Figure 56 : Cinétique d'extraction de l'huile essentielle d' <i>O. floribundum</i> de Kadiria.....	82
Figure 57 : Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle d' <i>O. floribundum</i> de Kadiria.....	84
Figure 58 : Principaux composés des huiles essentielles des échantillons d' <i>O. glandulosum</i>	90
Figure 59 : Chromatogramme CG/SM d' <i>O. glandulosum</i> d'Ouled Slama.....	90
Figure 60 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Thymus algériensis</i> de Chréa (1500m).....	94
Figure 61 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Thymus algeriensis</i> de Tazmalt.....	95
Figure 62 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Thymus algeriensis</i> d'El Asnam (Bouira).....	95
Figure 63 : Spectre de masse du 1, 6, 6-trimethylbicyclo [3.3.0] octan-3-one	102
Figure 64 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>T. numidicus</i> à α -terpineol	103
Figure 65 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>T. numidicus</i> à carvacrol	103
Figure 66 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>T. dreatensis</i>	111
Figure 67 : chromatogramme de l'huile essentielle de <i>T. munbyanus</i>	111
Figure 68 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>T. guyonii</i>	111
Figure 69 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>T. pallescens</i> de Tablat au début du cycle végétatif (récolte de 2005).....	121
Figure 70 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>T. pallescens</i> de Tablat en période de floraison (récolte de 2005)	121

Figure 71: Variation des teneurs des principaux composés (p-cymène, γ -terpinène et carvacrol) de l'huile essentielle de <i>Thymus Palleescens</i> en fonction des saisons (A : début, B : milieu, C : fin du cycle végétatif) et des années (2003-2006).....	122
Figure 72 : Variation des teneurs en monoterpènes, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes et sesquiterpènes oxygénés de l'huile essentielle de <i>Thymus Palleescens</i> en fonction des saisons (A : début, B : milieu, C : fin du cycle végétatif) et des années (2003-2006).....	123
Figure 73 : Evolution de la concentration de quelques composés majoritaires de <i>Thymus palleescens</i> au cours de l'extraction	130
Figure 74 : Réaction du radical DPPH [*] avec un antioxydant AH.....	137
Figure 75 : Activité de piégeage du radical DPPH [*] par les huiles des fractions 1 et 2 issues de la distillation de l'huile essentielle de <i>T. palleescens</i> de Boussaâda.....	140
Figure 76 : Réaction du TBA avec le malonaldéhyde pour former un chromogène.....	141
Figure 77 : Structure chimique de l'initiateur de radicaux libres, le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP).....	142
Figure 78 : Décomposition de l'initiateur de radicaux ABAP.....	142
Figure 79 : Activité antioxydante (%) des huiles essentielles de <i>T. munbyanus</i> , <i>T. numidicus</i> , <i>T. palleescens</i> (Tablat) et <i>T. guyonii</i> à différentes concentrations (mg/L) en utilisant le test TBARS en l'absence de l'initiateur de radicaux ABAP.....	145
Figure 80 : Activité antioxydante (%) des huiles essentielles de <i>T. munbyanus</i> , <i>T. numidicus</i> , <i>T. palleescens</i> (Tablat) et <i>T. guyonii</i> à différentes concentrations (mg/L) en utilisant le test TBARS en présence de l'initiateur de radicaux ABAP.....	145
Figure 81 : Intermédiaires réduits de l'oxygène : les 4 étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène....	147
Figure 82 : Pouvoir réducteur du BHA, BHT, tocopherol, acide ascorbique, des échantillons d' <i>Origanum floribudum</i> de Chréa (OF1), de Hammam Mélouane (OF2) et des échantillons d' <i>O. glandulosum</i> de Souhane (OG1), d'Ouled Slama (OG2) et d'Ighzer Amokrane (OG3).....	151
Figure 83 : Pouvoir réducteur du BHA, BHT, tocopherol, acide ascorbique et des échantillons de <i>T. palleescens</i> de Sidi Aissa (TP1), de Boussaâda (TP2), de Oued Rhio (TP3), de Kadiria (TP4), et d'El Asnam (TP5).....	151
Figure 84 : Pouvoir réducteur du BHA, BHT, tocopherol, acide ascorbique et des échantillons de <i>T. algeriensis</i> de Chrea à 800m d'altitude (ALG1), de Chréa à 1500m d'altitude (ALG2) et d'El Asnam (ALG3).....	152
Figure 85 : Pouvoir réducteur du BHA, BHT, tocopherol, acide ascorbique et des échantillons de <i>T. dreatensis</i> (TDR), <i>T. numidicus</i> (TNu), <i>T. guyonii</i> (TGu) et de <i>T. munbyanus</i> (TMu).....	152
Figure 86 : Zone d'inhibition des huiles essentielles de <i>Thymus palleescens</i> , <i>Thymus dreatensis</i> , <i>Thymus munbyanus</i> et <i>Origanum floribundum</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i>	155
Figure 87 : Zones d'inhibitions des huiles essentielles de <i>Thymus palleescens</i> , <i>Thymus dreatensis</i> , <i>Thymus munbyanus</i> et de l' <i>Origanum floribundum</i> sur <i>Staphylococcus epidermidis</i>	156
Figure 88 : Zones d'inhibition des huiles essentielles de <i>Thymus palleescens</i> , <i>Thymus dreatensis</i> , <i>Thymus munbyanus</i> et d' <i>Origanum floribundum</i> sur <i>Enterococcus faecium</i>	156

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1	
Chapitre I : Les huiles essentielles		
1. Historique	3	
2. Définitions	3	
3. Propriétés physico-chimiques	4	
4. Composition chimique	4	
5. Variabilité des huiles essentielles	5	
6. Localisation des huiles essentielles	5	
7. Fonctions biologiques	6	
8. Toxicité	6	
9. Utilisations	7	
10. Procédés d'extraction	8	
11. Analyse des huiles essentielles	9	
Chapitre II : Monographie du thym et de l'origan		
1. Le thym	17	
1.1. Historique.....	17	
1.2. Caractéristiques botaniques.....	17	
1.3. Biogéographie.....	18	
1.4. Composition chimique des huiles essentielles.....	20	
1.5. Biosynthèse.....	22	
1.6. Principales utilisations.....	27	
2. L'origan	28	
2.1. Historique.....	28	
2.2. Caractéristiques botaniques.....	28	
2.3. Description morphologique et biogéographie.....	28	
2.4. Huiles essentielles.....	30	
2.5. Principales utilisations.....	31	
Chapitre III : Oxydation et activité antioxydante		32
1. Introduction	32	
2. Mécanismes généraux de l'oxydation des lipides	32	
3. Les initiateurs de l'oxydation des lipides	36	
4. Les antioxygènes	39	
5. Tests de mesure de l'activité antioxydante et de l'état d'oxydation	45	
6. Conclusion	50	

Chapitre IV : Activité antimicrobienne	52
1. Introduction	52
2. Origines de la contamination	52
3. Principaux agents antimicrobiens	53
4. Activité antibactérienne	54
5. Rôle de la méthode dans la détermination de l'activité	55
6. Méthodes de détermination de l'activité	56
7. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	58
8. Conclusion	58
Chapitre V : Matériels et méthodes	60
1. Matériel végétal	60
1.1. Espèces étudiées.....	60
1.2. Méthodologie de l'échantillonnage.....	60
2. Description des espèces étudiées	61
2.1. <i>Thymus munbyanus</i> Boiss. et Reut.	61
2.2. <i>Thymus pallescens</i> De Noé	62
2.3. <i>Thymus dreatensis</i> Batt.	62
2.4. <i>Thymus algeriensis</i> Boiss. et Reut.....	63
2.5. <i>Thymus numidicus</i> Poiret.....	63
2.6. <i>Thymus guyonii</i> De Noé.....	64
2.7. <i>Origanum glandulosum</i> Desf.	64
2.8. <i>Origanum floribundum</i> Munby	65
3. Localisation des sites producteurs des huiles essentielles	65
4. Extraction des huiles essentielles	65
4.1. Cinétique de l'extraction.....	66
4.2. Rendement de l'extraction.....	66
5. Fractionnement des huiles essentielles	66
6. Caractérisation des huiles essentielles	66
6.1. Indices physicochimiques.....	66
6.2. Analyse qualitative et semi-quantitative par CPG et CG/SM.....	66
7. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles	68
7.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH [*]	68
7.2. Pouvoir d'inhibition des substances réactives au TBA (TBARS).....	68
7.3. Mesure du pouvoir réducteur.....	70
7.4. Pouvoir d'inhibition du radical hydroxyle (OH [*]).....	71
8. Concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC50)	73
9. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	73
9.1. Aromatogramme.....	73
9.2. Micro-organismes testés.....	73

9.3 Protocole expérimental.....	75
10. Analyse statistique.....	76
Chapitre VI : Résultats et discussions.....	77
1. Localisation des sites producteurs des huiles essentielles.....	77
2. Rendements des extractions.....	79
3. Cinétique d'extraction.....	81
4. Caractéristiques des huiles essentielles.....	82
4.1. Caractéristiques physiques et organoleptiques.....	82
4.2. Analyse qualitative et semi-quantitative par CPG et CPG/SM.....	84
4.2.1. Huiles essentielles de l'origan.....	84
4.2.1.1. <i>Origanum floribundum</i>	84
4.2.1.1.1. Composition des huiles extraites séparément des feuilles et des fleurs.....	87
4.2.1.2. <i>Origanum glandulosum</i>	89
4.2.2. Huiles essentielles du thym.....	93
4.2.2.1. <i>Thymus algeriensis</i>	93
4.2.2.2. <i>Thymus numidicus</i>	101
4.2.2.3. <i>Thymus munbyanus</i> , <i>Thymus guyonii</i> et <i>Thymus dréatensis</i>	107
4.2.2.4. <i>Thymus pallescens</i>	112
4.2.2.4.1. <i>Thymus pallescens</i> de différentes origines.....	115
4.2.2.4.2. Variation de la composition en fonction des saisons et des années.....	115
4.2.2.4.3. Compositions des huiles issues des feuilles et des fleurs.....	124
4.2.2.4.4. Effet du mode de séchage sur la composition de l'huile essentielle.....	127
4.2.2.4.5. Variation de la composition de l'huile essentielle au cours de l'extraction.....	129
4.2.2.4.6. Composition des fractions issues de distillation fractionnée.....	132
4.2.2.4.7. Effet de l'exposition à la lumière sur la composition.....	134
5. Activité antioxydante.....	135
5.1. Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	135
5.1.1. Activité de piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles de l'origan.....	135
5.1.2. Activité de piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles du thym.....	138
5.1.2.1. Huiles essentielles de <i>T. munbyanus</i> , <i>T. numidicus</i> , <i>T. pallescens</i> (Tablat) et <i>T. guyonii</i>	138
5.1.2.2. Huiles essentielles de <i>T. dréatensis</i> , de <i>T. algeriensis</i> et de <i>T. pallescens</i> de différentes régions.....	139
5.1.2.3. Huiles essentielles des deux fractions issues de la distillation de <i>T. pallescens</i> de Boussaâda.....	139
5.2. Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS).....	141
5.2.1. Activité des huiles essentielles de l'origan.....	142
5.2.2. Activité des huiles essentielles du thym.....	144

5.2.2.1. Huiles essentielles de <i>T. munbyanus</i> , <i>T. numidicus</i> , <i>T. pallescens</i> (Tablat) et <i>T. guyonii</i>	144
5.2.2.2. Huiles essentielles de <i>T. algeriensis</i> , <i>T. pallescens</i> de différentes régions et de <i>T. dreatensis</i>	145
5.3. Activité de piégeage du radical hydroxyle (OH•).....	146
5.4. Pouvoir réducteur	150
Conclusion.....	153
6. Activité antimicrobienne	154
CONCLUSION GENERALE	161
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165

Introduction

Introduction

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes aromatiques et médicinales, au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique.

La famille des Lamiacées est l'une des plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien et antioxydant (1). Les genres *Thymus* et *Origanum* appartiennent à cette famille et comprennent plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides. La majorité des espèces recensées en Algérie sont endémiques. Ces espèces sont riches en huiles essentielles et sont utilisées dans le domaine culinaire et en médecine populaire pour leurs propriétés antiseptiques, antidiarrhéiques et antibronchiques (2).

La valorisation des huiles essentielles et extraits végétaux passe par une indispensable étape de caractérisation et d'analyse.

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

L'oxydation lipidique est un phénomène qui entraîne une altération des propriétés sensorielles (goût, odeur et couleur), nutritionnelles et physiques des aliments dans lesquels elle apparaît (3). Il est indispensable pour les industriels de retarder au maximum ce processus d'oxydation.

Limiter le contact des produits avec l'air, la lumière ou les traces de métaux, est efficace pour lutter contre l'oxydation prématurée des lipides. Cependant, lors de la fabrication, du transport ou du stockage des aliments ces précautions peuvent s'avérer insuffisantes, et l'ajout d'antioxydants dans les formulations représente une alternative souvent indispensable. De nos jours, les composés synthétiques utilisés sont critiqués en raison des problèmes qu'ils peuvent engendrer sur la santé. La recherche s'oriente donc une fois de plus vers la nature d'où elle espère y puiser l'antioxydant parfait, à la fois sûr et efficace.

Les radicaux libres initient des réactions en cascade telle que la peroxydation lipidique (d'où altération des membranes et mort cellulaire) et sont directement impliqués dans les processus d'oxydation et induisent des dommages et des lésions sur l'ADN, les protéines cellulaires et les lipides membranaires. L'hyperproduction des radicaux libres est à la base de maladies cardiovasculaires, de diabète, de cancer et des explications physiopathologiques des grandes maladies dites neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, le vieillissement cérébral ainsi que diverses maladies chroniques (4). Cependant, la production des radicaux libres peut être stoppée ou limitée par des antioxydants.

D'un autre côté, l'usage extensif des agents antimicrobiens chimiques dans la médication humaine ainsi que dans les élevages d'animaux conduit à la sélection de souches bactériennes et fongiques plus résistantes (5).

Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments présentés sous diverses formes galéniques simples répondant à une réglementation précise en matière d'évaluation portant sur l'innocuité, l'efficacité thérapeutique et la stabilité.

Ainsi, les extraits de fruits et légumes et les extraits de plantes tels que les huiles essentielles ont focalisé ces dernières années un intérêt accru comme source potentielle de molécules naturelles bioactives pouvant constituer une alternative aux produits de synthèse. A cet effet, les huiles essentielles du thym et de l'origan comptent parmi les plus étudiées.

L'objectif de ce travail est double : d'une part, contribuer à la caractérisation des huiles essentielles de différentes espèces de thym et d'origan poussant en Algérie dont certaines d'entre elles n'ont pas encore fait l'objet de travaux antérieurs, et d'autre part d'explorer une possible valorisation de ces huiles par des essais d'activité antioxydante et antimicrobienne.

La première partie de ce travail sera consacrée à l'extraction et à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse seule et par CPG/SM des huiles essentielles de 6 espèces de thym et de 2 espèces d'origan dont respectivement trois et une sont endémiques d'Algérie.

Dans la seconde partie, les huiles essentielles seront testées pour leurs possibles activités antioxydante et antimicrobienne.

Chapitre I :
Les huiles essentielles

Chapitre I : Les huiles essentielles

1. Historique

Les huiles essentielles sont des substances naturelles utilisées depuis l'antiquité, on en trouve la trace en Egypte, 4000 ans environ avant Jésus Christ. Les huiles essentielles servaient alors à parfumer les onguents, à combattre la putréfaction lors d'embaumement des corps et à la conservation des aliments. Les arabes participèrent activement aux techniques de distillation des huiles essentielles, ils inventèrent l'alambic grâce auquel, ils purent obtenir des huiles très pures dont la médecine et la parfumerie en fait grand usage (6). A l'apogée des conquêtes des arabes musulmans en Afrique du Nord et en Espagne, ils le firent connaître des Espagnols, lesquels à leur tour le propagèrent en Europe, à travers les possessions du royaume d'Aragon, échelonnées tout le long des côtes du nord de la méditerranée (7).

En 1885, nous marquons les débuts dans l'ère chimique et c'est précisément depuis cette époque que les occidentaux commencèrent à absorber dans leur alimentation des colorants chimiques, des produits conservateurs précédant les antibiotiques et les hormones synthétiques. Les essences livrent progressivement leurs secrets d'utilisations depuis l'avènement de la chimie organique à la fin du XIX^{ème} siècle (8). Et ce n'est qu'au début du XX^{ème} siècle que les propriétés thérapeutiques des huiles essentielles ont fait l'objet de recherches scientifiques.

2. Définitions

Il est difficile de donner une seule définition d'une huile essentielle, car « il n'y a pas une réponse mais des réponses à cette question (9). En effet la notion d'huile essentielle peut varier avec le point de vue auquel se placent des personnes de formations professionnelles aussi dissemblables que des botanistes, des phytochimistes, des industriels, des parfumeurs ou des pharmacologues (10).

Le nom d'essences ou huiles essentielles désigne les principes volatils généralement odoriférants synthétisés par l'organisme végétal. Ces composés ont la propriété de se solubiliser dans les huiles et les graisses. Par conséquent, ils ont reçu empiriquement le nom d'huile essentielle. Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme « essentielle » désigne la caractéristique principale de la plante à travers ses exhalaisons (11).

Conner, (12) les définit comme suit : « Les HE sont des produits odorants, volatils du métabolisme secondaire d'une plante aromatique, normalement formés dans des cellules spécialisées ou groupes de cellules ».

L'association française de normalisation (**AFNOR**) définit une huile essentielle comme étant « un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (13). Cette définition est restrictive car elle exclut aussi bien les produits extraits à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé.

Bruneton (2) définit les termes les plus couramment utilisés dans ce domaine, tels que :

Pommade florale : Corps gras parfumé obtenu à partir de fleurs, soit par enfleurage à froid, soit par enfleurage à chaud.

Résinoïde : Extrait à odeur caractéristique, obtenu à partir d'une matière première sèche d'origine naturelle, par extraction à l'aide d'un solvant non aqueux.

Absolute : Produit ayant une odeur caractéristique, obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un Résinoïde par extraction à l'éthanol à température ambiante. La solution éthanolique obtenue est généralement refroidie et filtrée dans le but de supprimer les cires.

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

3. Propriétés physico-chimiques

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (2, 11). Les principales caractéristiques sont :

- Liquides à température ambiante.
- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- Volatiles et très rarement colorées.
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes.
- Un indice de réfraction qui varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse.
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau.
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques.
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de la conserver à l'abri de la lumière et de l'air.

4. Composition chimique

Les composants des huiles essentielles sont génériquement dits « aromatiques » en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique, ce qui peut prêter à confusion.

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes de molécules organiques appartenant aux classes les plus diverses. Ces molécules sont généralement :

- des **hydrocarbures** : Au sein de ce groupe, on distingue les hydrocarbures aromatiques, monoterpéniques ($C_{10}H_{16}$) et sesquiterpéniques ($C_{15}H_{24}$) et plus rarement diterpéniques (C_{20}). Quelques fois on rencontre des hydrocarbures saturés (heptane, octane, nonane, etc.).

- des **composés oxygénés** : A l'intérieur de ce groupe on rencontre des alcools aliphatiques et cycliques, saturés et insaturés, des éthers oxydes, des phénols, des aldéhydes, des cétones, des esters, des acides, des aldéhydes - phénols, des lactones, des composés sulfurés (14).

Il existe naturellement d'autres corps qui peuvent entrer en faibles proportions dans la constitution de certaines huiles essentielles : acides organiques, cétones de faible poids moléculaire, coumarines volatiles, flavonoïdes, etc. (11).

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont poly-moléculaires, (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'huile essentielle de Rose) (10). A côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces (15). Il existe certaines huiles dites mono, bi ou tri-moléculaires selon qu'elles sont constituées presque exclusivement d'une, de deux ou trois molécules majoritaires.

5. Variabilité des huiles essentielles

Une huile essentielle est très fluctuante dans sa composition, sur laquelle interviennent de nombreux paramètres, qu'ils soient d'ordre naturel, d'origine intrinsèque (génétique, localisation, maturité), d'ordre extrinsèque (sol, climat...) ou d'ordre technologique, c'est-à-dire liés aux modes d'exploitation du matériel végétal (11).

La composition d'une huile essentielle varie au sein d'un même genre et d'une même espèce. On parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Citons à titre d'exemple le basilic qui possède 4 chémotypes : basilic doux à linalool, basilic à méthyl chavicol, basilic à cinnamate de méthyl et basilic à eugénol (16).

Au cours du cycle végétal, des modifications importantes dans la composition des essences peuvent être relevées.

Les caractéristiques écologiques ont un effet déterminant sur la composition des huiles essentielles : facteurs géographiques (altitude, latitude, etc.), nature du sol, climat (ensoleillement, température, pluviométrie, etc) sont autant de paramètres responsables de variations.

Certains agents exogènes peuvent aussi avoir une influence. Ainsi, par exemple lorsque la menthe poivrée est parasitée par *Eriophyes menthae* (acarien), sa teneur en menthofuranne chute (11).

Enfin, une huile essentielle peut subir de profondes modifications lors de son exploitation (13) : récolte, séchage et stockage du matériel végétal, hydrodistillation, conditionnement.

6. Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal. Elles peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux comme les écorces chez le cannellier, les sommités fleuries chez le romarin et la menthe, les racines chez le vétiver, les rhizomes chez le gingembre, les fruits chez le fenouil, le bois chez le camphrier ...

Dans une même plante, elles peuvent être présentes dans différents organes avec des compositions différentes. Ainsi, on peut obtenir des huiles différentes à partir de la feuille, de la fleur et de l'écorce du fruit du citronnier.

Les essences peuvent être localisées dans des organes sécréteurs tels que les cellules sécrétrices et les poches sécrétrices, les poils et les canaux sécréteurs. Le tableau 1 résume les principales familles botaniques ainsi que les organes sécréteurs et quelques espèces correspondantes.

Parmi les espèces végétales (800 000 à 1 500 000 selon les botanistes) 10 % seulement sont dites «aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent d'infimes quantités d'essence aromatique par l'intermédiaire de poils, poches ou canaux sécréteurs (2).

Les teneurs en huiles essentielles sont généralement très faibles, à l'exception de celle du bouton floral de girofler où le rendement en huile essentielle atteint les 15 % en poids (18).

Tableau 1 : Principales familles botaniques et organes sécréteurs des huiles essentielles (17).

Familles	Organe sécréteur	Espèces
<i>Lamiaceae</i>	Poils	Lavande, thym, sauge, origan, menthe, sarriette, marjolaine, mélisse, basilic, romarin, etc.
<i>Ombellifères</i>	Canaux	Cumin, carvi, coriandre, anis vert, fenouil, etc.
<i>Lauracées</i>	Cellules	Cannelle, camphre, sassafras, etc.
<i>Myrtacées</i>	Poches	Cajeput, eucalyptus, niaouli, girofle, etc.
<i>Conifères</i>	Canaux	Pin sylvestre et maritime, cyprès, cèdre, genévrier.
<i>Rutacées</i>	Poches	Citron, orange, mandarine, bergamote, etc.

7. Fonctions biologiques des huiles essentielles

Bien que de nombreuses hypothèses aient été avancées pour expliquer les raisons de la synthèse de l'essence par la plante, nul ne sait avec exactitude les raisons pour lesquelles la plante fabrique son essence. (19) **Richard, 1992**). Mais ce qui est probable, c'est que le rôle des huiles essentielles au niveau du matériel végétal est intimement lié à leur situation.

Il est toutefois vraisemblable qu'ils aient un rôle écologique aussi bien dans le domaine des interactions végétales (agent allopathique, notamment inhibiteur de la germination) que celui des interactions végétal-animal (Protection contre les prédateurs, insectes, champignons, parasites telluriques et attraction des pollinisateurs) (2).

Certains terpènes linéaires interviennent dans le métabolisme de la plante, ils peuvent être employés comme source énergétique (20).

8. Toxicité des huiles essentielles

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées.

Cependant quelques informations sur certaines toxicités sont décrites par la littérature à savoir :

8.1. Toxicité par ingestion

En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL_{50} supérieures à 5 g/kg. En ce qui concerne la Sarriette et l'Origan la toxicité est un peu plus élevée avec une DL_{50} autour des 1,4 g/kg (données observée chez l'animal) (2). Chez l'homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, les plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'huiles essentielles : girofle (eugénol), eucalyptus, gaulthérie (salicylate de méthyl) (15).

8.2. Toxicité dermique

Le large usage que font la parfumerie et la cosmétique de ces huiles essentielles a suscité de nombreux travaux sur leur éventuelle toxicité (aigüe ou chronique) par application locale. Tous les ouvrages traitant des huiles essentielles donnent des concentrations maximales, les évictions, et les mises en garde nécessaires. Le thym, l'origan, la sarriette sont connues pour leur pouvoir irritant, l'angélique et la bergamote sont photosensibilisantes, la cannelle est dermocaustique et allergisante pour les peaux sensibles (15).

8.3. Toxicité selon la composition

Certains auteurs (21, 22) se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent. Une utilisation prolongée des huiles essentielles à thuyones (thuya, absinthe, sauge officinale) est neurotoxique. Ces huiles, dont la liste n'est pas exhaustive, sont inscrites dans un décret du Code de la Santé Publique Française datant de 1986 visant à interdire leur vente en France. Certaines d'entre elles sont néanmoins en vente libre dans les autres pays européens moins restrictifs (15).

8.4. Toxicité sur cellules animales ou humaines

Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxiques. Les huiles essentielles de thym et de lavande selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la lavande), sont cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois (23). Par ailleurs, des huiles essentielles de différentes variétés d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines dérivées de cancers (24).

9. Utilisation des huiles essentielles

Les domaines d'application des huiles essentielles diffèrent selon la plante dont elles proviennent mais surtout de la partie du végétal dont elles sont extraites (la fleur, la feuille, les racines et la graine). D'une manière générale, les essences extraites des racines sont reconnues pour leur action sur le système nerveux, celles extraites des graines et des fleurs pour leur impact sur l'ensemble du système digestif et celles issues des feuilles pour leur bienfait sur les systèmes respiratoire et cardiaque (25). A cet effet, les huiles essentielles sont recommandées en usage antibiotique, antiviral, antiseptique, fongicide, cicatrisant, digestif, anti-inflammatoire, sédatif, etc. (19).

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents, elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (12).

Elles sont également employées comme agents aromatisants naturels. La part des huiles essentielles dans l'aromatisation ne cesse de croître au dépend des composés aromatiques de synthèse (2).

Alors que les microbes deviennent de plus en plus résistants aux structures moléculaires de synthèse des antibiotiques, ils se heurtent plus difficilement à l'infinie diversité et à la complexité des huiles essentielles. Ainsi, l'aromathérapie semble proposer des solutions alternatives (19).

10. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants. Le procédé d'obtention des huiles essentielles intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique.

10.1. Expression à froid : Dans le cas de certaines essences d'agrumes (citron, orange), on procède par expression à froid du zeste frais, soit manuellement ou à l'aide d'une machine.

10.2. Extraction à la vapeur d'eau

Procédé utilisant la vapeur d'eau pour séparer les substances aromatiques.

10.3. Entraînement à la vapeur d'eau

Ce procédé consiste à récupérer l'huile essentielle des plantes en faisant passer à travers ces dernières un courant de vapeur d'eau, ces vapeurs saturées en composés organiques volatils sont condensées et récupérées par décantation.

10.4. Hydrodistillation

Consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une paroi froide et l'huile essentielle sera alors séparée par différence de densité. L'extraction qui s'effectue à température élevée et à pH acide durant une période plus au moins longue peut engendrer des réactions secondaires au sein de l'huile essentielle à savoir : hydrolyse, élimination, cyclisation et réarrangement.

10.5. Extraction par micro-ondes

Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement de micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle, l'huile essentielle est entraînée dans le mélange formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée. Très rapide et peu consommateur d'énergie, ce procédé fournit un produit en quantité supérieure à celle obtenue par l'hydrodistillation (2).

10.6. Extraction à l'eau surchauffée

Ce mode d'extraction utilise l'eau surchauffée sous pression entre 125 et 175°C. Il utilise l'eau désoxygénée qui traverse une cellule où se trouve la matière végétale. Cette cellule est maintenue à une pression d'environ 20 bars et à température constante.

10.7. Extraction distillations simultanées (SDE)

L'extraction distillation simultanées ou SDE (Simultaneous Distillation Extraction) est une extraction liquide-liquide qui est menée dans l'appareil de Likens et Nikerson modifié. Les composés volatils entraînés par

la vapeur d'eau sont extraits par des vapeurs de solvant que l'on condense ensuite dans un réfrigérant puis on recycle en continu le solvant.

10.8. Extraction par le CO₂ à l'état supercritique

Ce procédé est basé sur le fait que le CO₂ dans des conditions dites critiques présente un pouvoir de dissolution accru vis-à-vis de divers composés tels que les huiles essentielles, les arômes et les colorants ... (26).

Cette méthode utilisée d'abord en brasserie pour obtenir des extraits de houblon, semblait à priori intéressante d'une part pour augmenter le rendement d'extraction, d'autre part le CO₂ s'évaporant complètement ne laissait aucune trace toxique dans l'huile essentielle. Elle trouve un intérêt tout particulier au niveau des produits naturels, car elle conduit à des extraits « cœur de la nature » souvent très proches de l'odeur de la matière première traitée et exempts de solvants organiques (27).

10.9. Extraction au moyen de solvants

Certains organes de végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation. C'est le cas des fleurs de jasmin, d'œillet, de tubéreuse, etc. Il faut donc, pour ces végétaux, recourir à d'autres méthodes d'extraction des composés odorants volatils. Ces autres méthodes sont l'extraction par les solvants fixes (enfleurage et macération) et volatils (28).

10.9.1. Extraction par solvants fixes

ØEnfleurage : Ce procédé met à profit le caractère liposoluble des composants odorants des végétaux (2).

Il consiste, dès la récolte de fleurs fraîches, à les intercaler entre des couches de graisse animale qui retient le parfum. La « pommade » parfumée est lavée à l'alcool qui retient l'essence.

ØMacération : Ce procédé exige que les graisses utilisées soient chaudes, ce qui a pour effet d'augmenter leur pouvoir adsorbant. Cette technique est rapide et s'applique aux fleurs dont l'activité physiologique cesse à la cueillette. L'extraction est réalisée par immersion des fleurs fraîchement cueillies et constamment renouvelées dans un bac de graisses chaudes jusqu'à atteindre la saturation. Un épuisement à l'alcool absolu est généralement appliqué sur cette graisse (29).

10.9.2. Extraction par solvants volatils

Elle consiste à la mise en contact de la matière végétale avec un solvant qui dissout et extrait les constituants odorants solubles de la plante, le solvant ainsi chargé (le miscella) est ensuite évaporé et récupéré. Les matières végétales renferment souvent à côté d'une très faible quantité de composants aromatiques, un ballast énorme, solide ou liquide, qu'il faut séparer.

11. Analyse des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes constituées de plusieurs dizaines, voire de plusieurs centaines de composés, principalement des terpènes. Les terpènes sont « construits » à partir de plusieurs entités isopréniques, constituant une famille très diversifiée tant au niveau structural que fonctionnel. On rencontre principalement des mono et des sesquiterpènes (possédant respectivement 10 et 15 atomes de carbone) plus rarement des diterpènes (20 atome de carbone). Les huiles essentielles peuvent contenir également des composés aliphatiques (non terpéniques) ou des phényles propanoïdes.

Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que la pharmacie, la cosmétique, la parfumerie et l'agroalimentaire.

11.1. Les techniques d'analyse conventionnelles

De manière schématique, on distingue deux démarches analytiques en fonction de l'objectif recherché. La première est d'élucider la structure d'une molécule qui n'a jamais été décrite dans la littérature : il s'agit de l'analyse structurale. La seconde est l'identification et la quantification d'un composé déjà connu et dont les caractéristiques spectrales sont décrites.

11.1.1. L'analyse structurale

L'analyse structurale est basée sur la purification préalable des constituants par différents techniques chromatographiques, chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie liquide sur colonne ouverte (CLC), chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ou chromatographie en phase gazeuse préparative (CPGP). Elle requiert donc une quantité suffisante de produit pur afin de réaliser une étude complète par toutes les méthodes spectroscopiques habituelles, Spectrométrie de masse (SM), Infra-Rouge par Transformée de Fourier (IRTF), Ultra-Violet (UV), Résonance Magnétique Nucléaire (RMN du proton et du carbone-13, RMN bidimensionnelle) (30, 31). A partir de la combinaison de toutes ces techniques complémentaires, il est possible d'établir la structure chimique de la molécule inconnue.

11. 1. 2. Identification des constituants dans un mélange complexe

La deuxième démarche, consiste à identifier les substances déjà décrites dans la littérature, pour caractériser un mélange. Actuellement, on distingue trois tendances pour l'analyse des mélanges complexes naturels (Figure1).

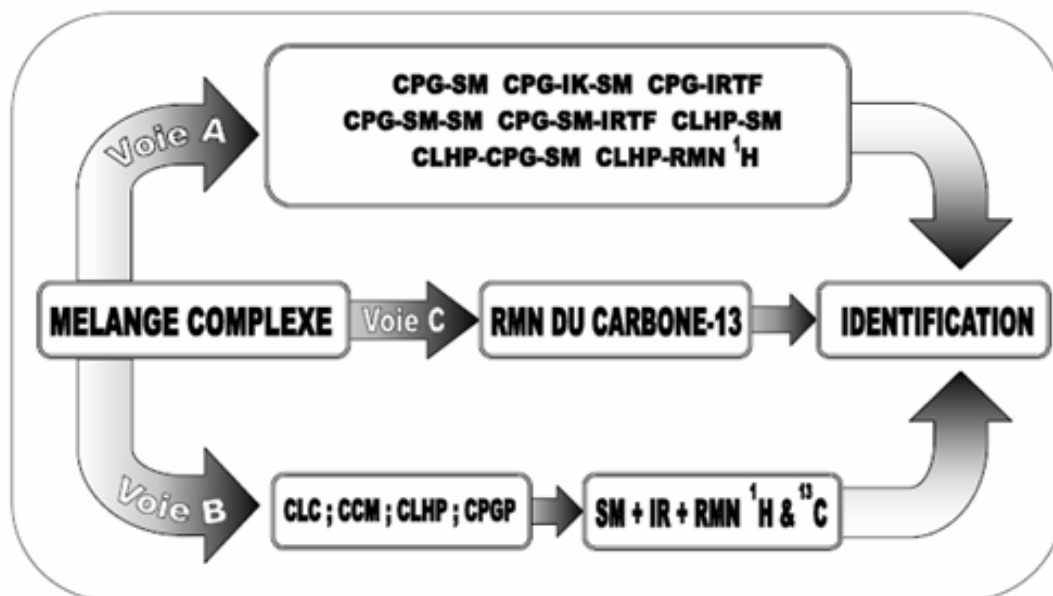


Figure 1 : Les méthodes d'analyse d'un mélange complexe

- ü La voie A est basée sur l'identification des constituants par le couplage « en ligne » d'une ou de plusieurs techniques chromatographiques et d'une ou de plusieurs techniques spectroscopiques qui permettent l'individualisation et l'identification des constituants. Elle est la plus couramment utilisée, tout au moins pour les analyses de routine.

- Ü La voie **B** fait intervenir la séparation de ces mêmes constituants, y compris les produits minoritaires, par diverses techniques chromatographiques, telle que la CMC, la CLC, la CLHP, CPGP ou encore par distillation fractionnée ou par cristallisation. Leur identification est alors réalisée par comparaison des données spectrales des composés isolés (SM, IR, RMN du proton et du carbone 13) avec celles de produits de référence. Cette voie se rapproche de celle mise en œuvre pour l'identification structurale de molécules nouvelles.
- Ü La voie **C**, intermédiaire par rapport aux précédentes, met en œuvre la RMN du carbone 13 sans séparation préalable des constituants.

11. 1. 2. 1. Analyse par les couplages conventionnels (voie A)

a. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse semi-quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit (32).

Pour chacun des composés, deux indices de rétention polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kovats) ou en programmation de température (indice de rétention). Ils sont ensuite comparés avec ceux de produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature). Toutefois, il est fréquent d'observer des variations, parfois importantes, lorsque l'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire et ceux de la littérature (en particulier sur colonne polaire). C'est pourquoi la comparaison des indices sur deux colonnes de polarité différente est nécessaire.

Malgré tout, ceci ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CPG et une technique d'identification spectroscopique : en général la spectrométrie de masse (CPG/SM) ou plus rarement l'IRTF. La combinaison de ces deux techniques complémentaires, est applicable à l'analyse d'un grand nombre de substances organiques, aussi bien gazeuses que liquides.

b. Le couplage CPG/SM

Le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine de huiles essentielles. Il permet de connaître, dans la grande majorité de cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation (33, 34). Dans la source d'ionisation les molécules sont bombardées à l'aide d'électrons, conduisant ainsi à la formation de ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus utilisés pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le « piège à ion » ou « ion trap ».

Le quadripôle ainsi que l'« ion trap » utilisent la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge (m/z) (35, 36). Les analyseurs quadripolaires sont constitués de quatre barres cylindriques (ayant idéalement une section hyperbolique). Un ion positif pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Si le potentiel change de signe avant qu'il ne soit déchargé sur cette barre, il changera de direction. Dans les appareils à quadripôle, on règle les potentiels de manière telle que les ions d'une masse déterminée seulement traversent les barres. Les ions sont donc soumis à l'influence d'un champ électrique total

constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant résultant de l'application sur les barres de tensions électriques positives et négatives.

En ce qui concerne l'« ion trap », il est constitué d'une électrode circulaire, couverte de deux calottes sphériques. Conceptuellement, on peut voir cet appareil comme un quadripôle circulaire (35). La superposition des tensions continues et alternatives permet d'obtenir une sorte de « quadripôle à trois dimension » dans lequel les ions sont gardés captifs (« piégés ») sur une trajectoire. Les ions de différentes masses sont présents simultanément dans la trappe, et on cherchera à les expulser en fonction de leur masse pour obtenir le spectre. Cette technique consiste donc à produire des ions directement dans la trappe par impact électronique.

Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, est ensuite détecté et transformé en un signal utilisable. Finalement, l'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre masse et les convertit en valeurs des masses et des intensités de pics et en courant ionique total. Il permet l'examen de données enregistrées et leur manipulation : spectres de masse, chromatogrammes reconstitués, soustraction d'un spectre par rapport à un autre, calcul d'une moyenne sur plusieurs spectres, etc...

Les spectres de masse ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles (figure 2), commerciales (NIST ou National Institute of Standards and Technology, Wiley Registry of Mass Spectral Data, König-joulain, intitulée « Terpenoids and Related Constituents of Essential oils » contenant 1200 composés) ou construite au laboratoire. Les spectres de masse expérimentaux peuvent aussi, si besoin, être comparés à des spectres contenus dans des bibliothèques non informatisées (37-40).

Si, dans la grande majorité des cas le couplage CPG/SM fonctionne correctement, certains auteurs ont souligné les difficultés rencontrées lors de l'identification de molécules possédant des spectre de masse insuffisamment différenciés, voir superposables, comme pour le 1-endo-bourbonanol (sesquiterpène tricyclique) et le 1,6-germacradièn-5-ol (monocyclique) (41). C'est donc le cas de certains sesquiterpènes et diterpènes, puisque ces molécules sont construites des mêmes entités isopréniques.

On rencontre ce problème non seulement avec les composés ayant une structure très proche (stéréoisomères), comme le (E,Z)- α -farnesene et le (Z,Z)- α -farnesene ou encore le (Z)- β -farnesene et le (E)- β -farnesene, mais également avec des molécules ayant des squelettes différents mais des spectres de masse relativement très proches comme pour le (E,Z)- α -farnesene (sesquiterpène linéaire) et le cis- α -bergamotene (sesquiterpène bicyclique) (42). C'est pourquoi, l'identification d'une molécule nécessite, de préférence, d'avoir son spectre de masse et ses indices de rétention sur deux colonnes identiques à ceux des produits de référence. Ainsi, divers auteurs (43-45) ont développé des logiciels de traitement des données facilitant l'identification de composés présents dans une huile essentielle à partir de leur spectre de masse et des valeurs de leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire.

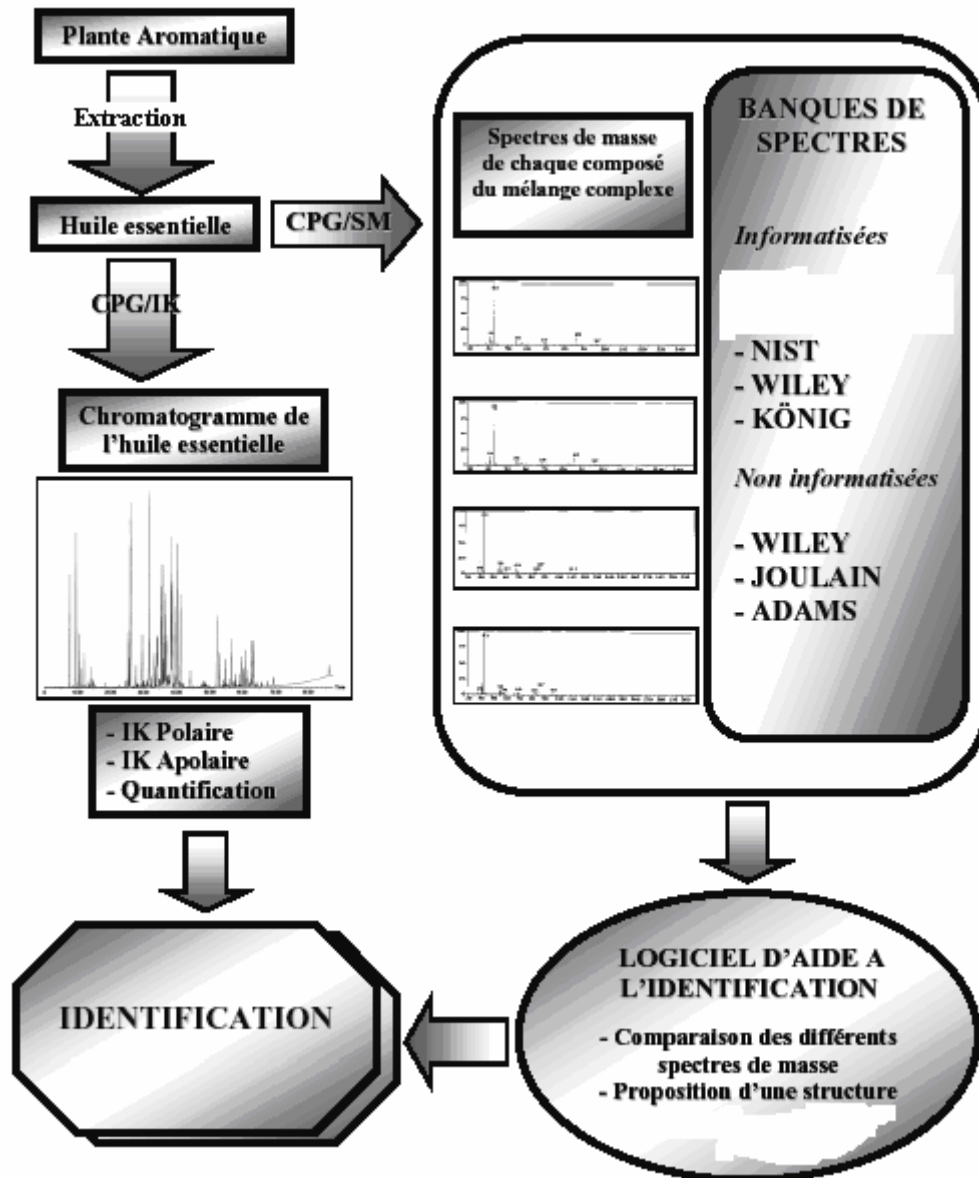


Figure 2 : Identification des composés d'une huile essentielle par CPG/IK et CPG/SM.

c. Le couplage CPG/SM-ICP et CPG/SM-ICN

Le couplage CPG/SM en mode ionisation chimique (IC), positive (ICP) ou négative (ICN) constitue une technique d'« ionisation douce » permettant d'accéder par exemple à la masse moléculaire d'un composé, alors que ce même pic moléculaire n'est pas observable en IE (46). L'ionisation chimique est disponible pour l'analyseur quadripolaire mais aussi pour le piège à ion ou « ion trap ».

L'ionisation chimique consiste à produire des ions par collision de la molécule à ioniser avec des ions primaires présents dans la source. On cherche donc à provoquer des collisions ion-molécule dans une partie délimitée de la source. Pratiquement toutes les substances neutres sont susceptibles de donner des ions positifs (ICP), alors que les ions négatifs nécessitent la présence de molécules comportant un ou plusieurs atomes électronégatifs permettant la capture d'électrons (47).

Ainsi, la distinction entre un alcool et l'acétate correspondant est en général possible par l'observation en SM-IP du pic moléculaire, alors qu'en SM-IE les deux molécules peuvent perdre, soit une molécule d'eau ou une molécule d'acide acétique, et présenter des spectres de masse identiques (39, 43-45, 48). De la même façon, la différenciation de divers isomères de dérivés pinaniques (α -pinène, β -pinène et cis- δ -pinène, pinocamphone et isopinocamphone, nopinone et isonopinone, etc...) est possible en ICP en utilisant l'ammoniac comme gaz ionisant (49). L'ICN a été utilisée pour accéder à la masse moléculaire de certaines substances soufrées et de leur abondance relative. Néanmoins, cette technique d'ionisation douce doit surtout être considérée comme une technique complémentaire de la SM-IE pour l'identification des constituants des huiles essentielles (50).

d. Le couplage CPG/SM/SM

Les nombreuses difficultés rencontrées lors de l'analyse de mélanges, que ce soit dans le domaine médical (drogues, poisons), dans la recherche de polluants dans l'environnement ou dans l'étude de coupes pétrolières, etc... ont conduit, récemment, à la mise en œuvre de la spectrométrie de masse multidimensionnelle à double analyseur (SM/SM) (51), ou à triple analyseur (52). Cette technique habituellement couplée à la CPG, permet la sélection d'un ion puis sa fragmentation dans un deuxième spectromètre, celle-ci pouvant être réalisée en présence d'un gaz réactif. Les fragments de l'ion secondaire constituent un deuxième spectre de masse qui diffère en fonction de l'origine de l'ion primaire. Ainsi, **Decouzon** et coll. ont montré que le couplage SM/SM-ICN permet de différencier quatre stéréoisomères du dihydrocarvéol à partir des fragments caractéristiques induits par la stéréochimie de la molécule (position axiale ou équatoriale des groupements hydroxyle et méthyle) alors que ce n'est pas le cas pour la SM-ICN (259).

e. Le couplage CPG/IRTF

Le couplage de la CPG avec l'IRTF permet l'analyse de substances volatiles. En effet, l'IRTF renseigne sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules, différencie les stéréoisomères géométriques éventuels et permet l'identification de certaines molécules. Ainsi, **Joulain** et coll. ont démontré que deux alcools sesquiterpéniques : le 1-endobourbonanol (tricyclique) et le 1,6-germacradiène-5-ol (monocyclique), qui possèdent des spectres de masse identiques, peuvent être différenciés à l'aide de leur spectre infrarouge et de leurs indices de rétention (53). De même du fait de la transposition thermique, à l'intérieur de la source du spectromètre, conduisant au γ -élémente à partir du germacrène B et au bicycloélémente à partir du bicyclogermacrène, ces deux couples de composés ont les mêmes spectres de masse en SM-IE. En revanche, l'identification de ces sesquiterpènes est possible à partir de leurs spectres IRTF en phase vapeur (54). Cependant, dans le domaine des huiles essentielles cette technique doit plutôt être utilisée en complémentarité de la SM et des indices des indices de rétention (IK), plutôt que seule (55).

f. Le couplage CPG/IRTF/SM.

Ponctuellement, la CPG couplée à deux détecteurs spectroscopiques (IRTF et SM) est utilisée pour la caractérisation des huiles essentielles. Par exemple, l'analyse par CPG/IRTF/SM d'une huile essentielle d'*Eucalyptus australiana* (56), contenant le 1,8-cinéole comme produit fortement majoritaire, a permis

l'identification d'un nombre important de produits en faible quantité. De plus, une meilleure séparation et détection peuvent être obtenus par l'utilisation de la CPG multidimensionnelle (CPGMD) à trois colonnes, une pré-colonne de polarité intermédiaire et deux colonnes analytiques polaire et apolaire, combinées avec deux détecteurs spectroscopiques (CPGMD/IRTF/SM) (57).

g. Les couplages CLHP/SM et CLHP/CPG/SM

Malgré les incompatibilités opérationnelles apparentes de ces deux techniques (vide poussé, hautes températures et spectres de masse obtenus en phase gazeuse pour la SM, hautes pressions, températures relativement basses et phase liquide pour la CLHP), le couplage CLHP/SM permet d'accéder à la caractérisation de la fraction non volatile des produits naturels, qui peut comprendre les limonoïdes, les flavonoïdes, les coumarines, etc... Ainsi, **Cremin et Coll.** ont utilisé ce couplage pour l'identification d'esters sesquiterpéniques dans des extraits méthanoliques de plusieurs champignons pathogènes du genre *Armillaria* (58). Par ailleurs, un couplage CLHP/UV/SM a été mis en œuvre pour l'analyse d'extraits végétaux (59).

Dans le couplage CLHP/CPG/SM, l'utilisation de la CLHP permet un premier fractionnement. En effet, les constituants sont séparés par classe de composés avant l'introduction dans la colonne capillaire de la CPG, où une nouvelle séparation est réalisée. Ce pré-fractionnement permet une fiabilité plus grande dans l'identification par SM en limitant les coélutions (60, 61).

h. Le couplage CLHP/RMN ¹H

Il convient de signaler enfin, l'existence d'un couplage direct entre la CLHP et la RMN ¹H permettant d'obtenir des informations structurales. Deux méthodes peuvent être utilisées : la première méthode dite par « flux non continu » consiste à arrêter l'élution quand un constituant est présent dans la sonde du spectromètre. La seconde méthode est dite par « flux continu » et l'acquisition des données est faite à l'aide d'une sonde où le liquide est en écoulement. Ce type de couplage présente des inconvénients comme la présence de solvants protonés dans les échantillons à analyser. Cette difficulté est contournée par la mise en œuvre de techniques d'irradiation sélective ou par l'utilisation de solvants deutériés. Cette association est surtout utilisée dans l'industrie pharmaceutique : l'étude de mélanges simples, comme l'identification des impuretés dans les drogues ou les métabolites de médicaments et des vitamines (62, 63).

11. 1. 2. 2. Séparation des constituants préalablement à leur identification (VoieB)

Dans la voie **B** (Figure 1), l'identification des différents constituants présents dans une huile essentielle nécessite un fractionnement de cette même huile essentielle par distillation fractionnée et/ou par plusieurs techniques chromatographiques (CCM, CLC, CLHP ou CPGP), suivi de leur identification par comparaison des données spectrales avec celles de composés de référence : spectres de masse, spectres IR, spectres de RMN du proton et carbone 13, RMN bidimensionnelle, lorsque la quantité de produit isolé est suffisante. Cette voie est indispensable lorsqu'il s'agit d'élucider la structure d'un composé qui n'a jamais été décrit. Elle est d'une fiabilité et d'une efficacité indiscutables quand il s'agit de l'identification dans une huile essentielle, des

constituants dont la structure est connue, mais elle demande énormément de temps que ce soit pour le fractionnement, la purification des produits que pour leur identification.

11. 1. 2. 3. Analyse RMN du carbone-13 sans séparation préalable (Voie C)

L'utilisation de la RMN pour l'identification de molécules connues présentes dans une huile essentielle a été non seulement suggérée mais fortement conseillée (64). Afin d'éviter ou tout au moins de réduire les fastidieuses étapes de purification, il était donc intéressant de pouvoir utiliser la RMN sans passer par une séparation préalable des constituants, pour l'analyse d'un mélange complexe. Dans cette optique l'utilisation de la RMN du carbone-13 qui permet d'avoir des spectres simplifiés s'imposait. En fait jusqu'au début des années 90, la RMN permettait de contrôler la présence d'un composé préalablement identifié ou suspecté par une autre technique (CPG/SM par exemple). L'informatisation de la recherche des structures à partir de bibliothèques de spectres a permis d'en faire une véritable méthode d'analyse appliquée à différentes familles de composés naturels : terpènes dans les huiles essentielles (65, 66), acides diterpéniques dans les résines, triterpènes dans les extraits de liège (67), phénols et sucres anhydres dans les liquides de pyrolyse de la biomasse (68), sucres dans les miels (69), etc....

Chapitre II :

Monographie du thym et de l'origan

Chapitre II : Monographie du thym et de l'origan

1. Le thym

1.1. Historique

L'origine du mot Latin « *Thymus* » n'est pas tout à fait tranchée. Certains auteurs supposent qu'il provient du Grec *thyo* (parfumer). Une autre interprétation étymologique considère qu'il provient du mot grec « *thymos* » (courage, force) (70). Cette dernière supposition est la plus rapportée dans la littérature.

Plante sacrée dans l'antiquité, le thym était un symbole de force chez les romains ; il était brûlé au cours des sacrifices et utilisé comme encens dans les temples grecs, on s'en servait aussi pour aromatiser les fromages et les boissons alcooliques et les militaires en mettaient dans leur bain pour se donner de la vigueur.

Les sumériens et les égyptiens de l'antiquité l'utilisaient pour embaumer leurs morts. Une vieille tradition indique que cette plante était l'une des herbes qui ont formé le lit parfumé de la vierge Marie. Connue par Hippocrate et Dioscoride, elle était parmi les premières plantes médicinales dans la région méditerranéenne. Le thym est très largement utilisé en qualité de plante aromatique, en particulier dans la cuisine méditerranéenne en tant que condiment (71).

Théophraste et Dioscoride, en Grèce, le disaient propre à calmer les convulsions, à réduire les inflammations de l'intestin et du foie, à provoquer les règles lorsqu'elles sont défectueuses, et à calmer les spasmes de toute nature. Charlemagne, quant à lui, en avait ordonné la culture dans ses capitulaires (72).

1.2. Caractéristiques botaniques

1.2.1. Classification

Parmi la famille des Lamiaceae (Labiatae) qui compte environ 220 genres, *Thymus* est l'un des huit plus importants genres, compte tenu du nombre d'espèces qu'il comprend, bien que ce nombre varie selon le point de vue taxonomique. Si l'on choisit les critères qui minimisent la variabilité, les données disponibles rapportent 215 espèces pour le genre *Thymus*. C'est un nombre qui n'est dépassé que par les genres *Salvia*, *Hyptis*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Teucrium*, *Nepeta*, *Plectranthus* (70).

L'extrême variabilité et les hybridations interspécifiques, ont rendu la détermination des espèces très délicate (73).

La famille des Lamiaceae (Labiatae) est l'une des familles botaniques les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antioxydant et antibactérien (1). Elle regroupe entre 200 et 250 genres et entre 3200 et 6500 espèces (74).

Selon **Engler (1892-1926)**, le thym appartient au :

Règne	: Plantae (végétal)
Embranchement	: Spermaphytes (phanérogames)
Sous embranchement	: Angiospermes
Classe	: Dicotylédones
Sous classe	: Métachlamydées (gamopétales)
Ordre	: Tubiflorales

Sous ordre	: Verbénacées
Famille	: Lamiaceae (Labiæ)
Sous-famille	: Stachyoideae
Genre	: <i>Thymus</i>

1.2.2. Description morphologique

De façon générale, le thym est une plante sous-ligneuse érigée ou prostrée, odorante, il forme des touffes compactes très ramifiées qui s'élèvent à une vingtaine de centimètres au-dessus du sol. Il pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocaillieux et dans les garrigues.

Les feuilles du thym sont plus ou moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice quant à lui, est tubuleux à deux lèvres et la corolle est plus ou moins exserte à deux lèvres aussi (73).

1.3. Biogéographie

1.3.1. Répartition dans le monde

Le thym est largement distribué dans le vieux continent (Figure 3). La région ouest de la méditerranée peut être considérée comme le centre du genre *Thymus*. Ce genre est divisé en 8 sections et l'origine de plusieurs espèces a souvent été attribuée à la région méditerranéenne. En effet, seules des espèces de deux sections poussent hors de cette région. Sept sections sont répandues à travers la péninsule ibérique et le nord ouest africain dont 5 sont endémiques (70).

C'est une plante très répandue dans le nord ouest africain ainsi que dans les montagnes d'Ethiopie, les montagnes d'Arabie du sud ouest et la péninsule du Sinaï. Passant par les régions arides de l'Asie occidentale jusqu'à l'Himalaya, il peut même atteindre les limites de la région tropicale et du Japon. Dans le nord, il pousse en Sibérie et en Europe nordique (75).

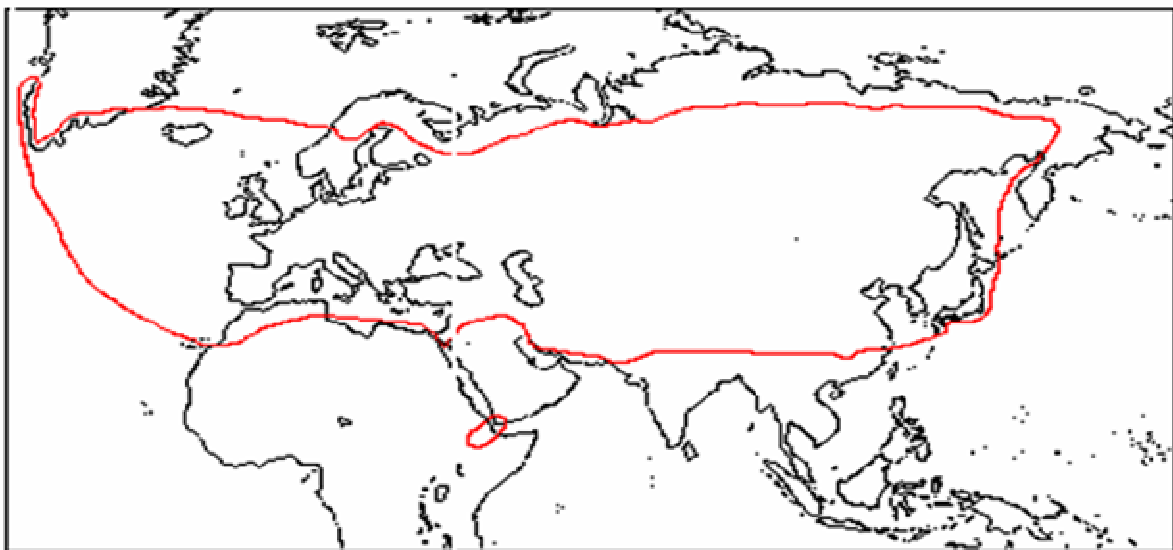


Figure 3 : Répartition géographique du thym dans le monde (76)

1.3.2. Répartition en Algérie

Les espèces de thym sont réparties du Nord algérois à l'Atlas saharien, et du constantinois à l'oranais (tableau 2). Ce tableau donne les espèces citées par Morales en 2002. Quezel et santa (1963) ont cité 12 espèces dont 5 ne figurent pas dans ce tableau telles que : *T. commutatus* (Ball.) Batt., *T. capitatus* (L.) Hoffm. et Link., *T. pallidus* Coss., *T. glandulosus* Coss., *T. hirtus* Wilid. A l'exception de *Thymus hirtus* les 4 premières espèces ont été qualifiées de très rares.

Tableau 2 : Principales localisations géographiques du thym en Algérie° (70,73)

Espèce	Section*	Localisation et caractéristiques de l'espèce
<i>T. palleescens</i> de Noé (<i>T. fontanesii</i> Boiss. et Reuter)	Section VII. <i>Hypbodromi</i> (A. Kerner) Halácsy Subsect. VII 3. <i>Thymbropsis</i> Jalas ex R. Morales	- Commune dans le tell - Endémique Algérienne.
<i>T. broussonetii</i> Boiss. Subsp. <i>Broussonetii</i>	Section VII. <i>Hypbodromi</i> (A. Kerner) Halácsy Subsect. VII 3. <i>Thymbropsis</i> Jalas ex R. Morales	- Endémique algéro-marocaine.
<i>T. lanceolatus</i> Desf.	Section VII. <i>Hypbodromi</i> (A. Kerner) Halácsy Subsect. VII 3. <i>Thymbropsis</i> Jalas ex R. Morales	Rare dans : - Le sous secteur de l'atlas tellien (Terni) et de l'atlas tellien (Médéa, Benchicao). - Le sous secteur des hauts plateaux Algérois, Oranais (Tiaret) et constantinois. - Endémique Algérienne.
<i>T. dreatensis</i> Batt.	Section VIII. <i>Serpyllum</i> (Miller) Bentham Subsect. VIII 1. <i>Insulares</i> Jalas	-Très rare dans le sous secteur du tell constantinois et de la petite Kabylie. - Endémique Algérienne.
<i>T. numidicus</i> Poiret	Section VII. <i>Hypbodromi</i> (A. Kerner) Halácsy Subsect. VII 3. <i>Thymbropsis</i> Jalas ex R. Morales	-Assez rare dans le sous secteur de l'atlas tellien, le secteur du tell constantinois et la petite et grande Kabylie. - Endémique algéro-Tunisienne
<i>T. guyonii</i>	Section VIII. <i>Serpyllum</i> (Miller)	-Rare dans le sous secteur des

De Noé	Bentham Subsect. VIII 1. <i>Insulares</i> J alas	hauts plateaux Algérois, Oranais et constantinois. - Endémique Algérienne.
<i>T. algériensis</i> Boiss. et Reuter	Section VII. <i>Hypbodromi</i> (A. Kerner) Halácsy Subsect. VII 1. <i>Subbracteati</i> (Klokov) J alas	-Très commun dans toutes les régions montagneuses et rare ailleurs. -Espèce Nord Africaine (Algérie, Maroc, Tunisie, Libye). - nombre de chromosomes : 2n= 30,56
<i>T. munbyanus</i> subsp. <i>munbyanus</i> Desf.	Section V. <i>Pseudothymbra</i> Bentham Subsect. V 1. <i>Pseudothymbra</i> (Bentham) R. Morales	-commune dans les montagnes du Nord. -Endémique algéro-marocaine.
<i>T. bleicherianus</i> Pomel	Section V. <i>Pseudothymbra</i> Bentham Subsect. V 1. <i>Pseudothymbra</i> (Bentham) R. Morales	-Endémique algéro-marocaine. -Nord –Est 400-450m d'altitude.
<i>T. wildenowii</i> Boiss.	Section VI. <i>Thymus</i> Subsect. VI 2. <i>Thymus</i>	- Espagne (Gibraltar), Maroc, Algérie. -Commune sur les montagnes du Nord jusqu'à une altitude de 1200-2400 m. - Nombre de chromosomes : 2n=30
<i>T. heymalis</i> Lange Subsp. <i>fumanifolius</i> (Pau) R. Morales	Section VI. <i>Thymus</i> Subsect. VI 2. <i>Thymus</i>	-Endémique algéro-marocaine. - Cotes du Nord-Est jusqu'à une altitude de 100m.

° Les espèces et les sections correspondantes sont celles citées par Morales (70) tandis que les localisations, quand elles sont disponibles, sont celles citées par Quezel et Santa (73).

*Une section doit être comprise comme étant un groupe d'espèces qui ont plusieurs caractères morphologiques communs entre elles plus qu'elles n'en ont avec d'autres espèces.

1.4. Composition chimique des huiles essentielles.

L'huile essentielle du thym est extraite principalement à partir des feuilles et des sommités fleuries. Les feuilles et/ou la tige fleurie du thym contient en plus de l'huile essentielle des flavonoïdes (thymonine, cirsilinéol, méthoxy-cirsilinéol...) et des acides-phénols (notamment caféique et rosmarinique), des tanins et une résine (77).

L'huile essentielle du thym est une huile susceptible de présenter de grandes variations, qui sont principalement d'origine génétique et édaphoclimatiques, elle dépend également de la saison de cueillette (stade végétatif). **Stahl-Biskup** (76) a recensé les résultats des analyses publiées sur la composition chimique de **373** huiles essentielles relatives à **162** espèces de thym de différents pays. Cette étude qui s'étale de 1961 jusqu'en 2002 est partiellement résumée par la figure 3. D'après cette étude environ **270** terpènes sont présents dans les huiles essentielles du genre *Thymus* dont **52** sont à une concentration supérieure à **10%**.

La figure 4 concerne les **34** terpènes les plus importants (axe des ordonnées) sur les 52 précédemment cités. Sur l'axe des abscisses est reporté le nombre de taxons (espèces, sous-espèces et variétés) dans lesquels le terpène a été obtenu à une teneur de plus de 10%.

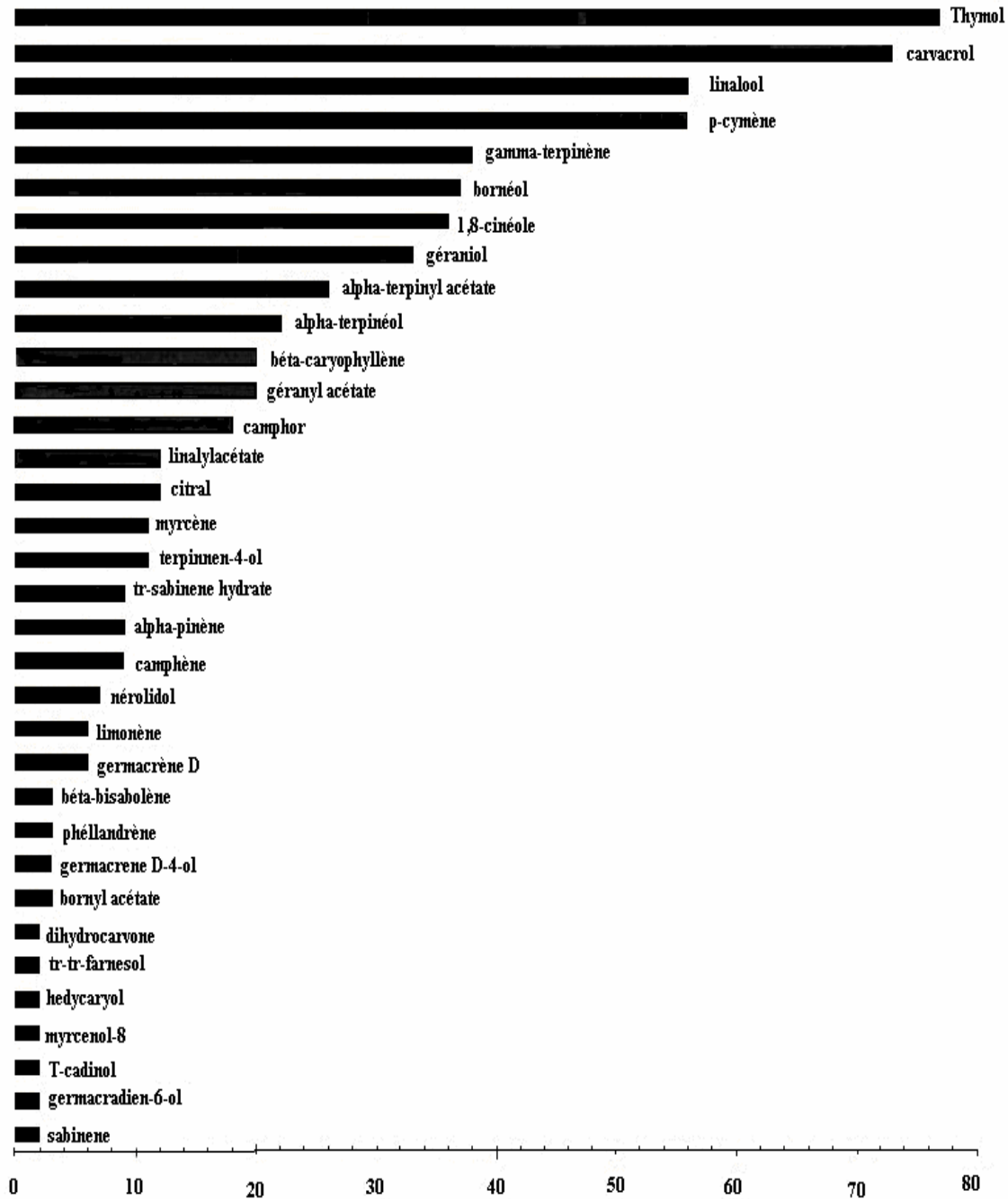
Le thymol et le carvacrol viennent au premier rang. On les retrouve dans 77 et 73 taxons respectivement. Les rangs occupés par les hydrocarbures monoterpéniques ; p-cymène (56 taxons) et γ -terpinène (38 taxons) ne peuvent pas être considérés indépendamment de la présence du thymol et du carvacrol. En effet, ces 4 terpènes sont étroitement liés par un processus biosynthétique et sont considérés comme étant les précurseurs biologiques des deux phénols. Par conséquent, on les rencontre simultanément dans les huiles essentielles du thym. Le plus souvent, les deux phénols sont plus abondants que leurs précurseurs. Dans quelques huiles, c'est le cas opposé qui a lieu et on retrouve le p-cymène ou le γ -terpinène comme composé principal.

Dans les huiles essentielles du thym, les sesquiterpènes ne sont souvent pas très importants. Le β -caryophyllène est le plus fréquemment représenté : il a été détecté à des concentrations supérieures à 10% dans 20 huiles essentielles du genre *Thymus*. Cependant, il n'a pas encore été détecté comme composé le plus important.

Les hydrocarbures non terpéniques sont présents dans plusieurs espèces de thym à de faibles concentrations. Les composés ayant une chaîne à 8 atomes de carbone sont les plus fréquents, par exemple : 3-octanol, 1-octen-3-ol, 3-octanone, 3-octyl acétate, 1-octen 3-yl- acétate. Les composés correspondants à 6 atomes de carbone arrivent en seconde position, suivis par les dérivés à 9 atomes de carbone. Enfin, plus de 62 composés différents appartenant à la classe des hydrocarbures non terpéniques peuvent être détectés dans les huiles essentielles du genre *Thymus*.

Les résultats de cette étude font apparaître une grande variabilité de la composition chimique des huiles essentielles du genre *Thymus* avec plus d'une quinzaine de chémotypes. Il est dès lors extrêmement important de bien connaître la composition chimique et de ne pas dire « du thym, c'est du thym ». Le tableau 3 donne des exemples de quelques chémotypes.

Entre 2002 et 2007 nous avons recensé plus de 30 travaux publiés sur la composition chimique des huiles essentielles du thym de différentes origines (78-112). L'une de ces études rapporte deux nouveaux chémotypes pour le genre *Thymus* (111) caractérisés par le myrcène, le limonène, le β -caryophyllène et le γ -muurolène, comme composés majoritaires avec une teneur de plus de 10%, pour l'une des espèces ; le myrcène, le pinocarvyl acétate, le β -caryophyllène, le γ -muurolène et le germacra-1(10), 4-dien-6-ol comme composés majoritaires pour l'autre espèce.



Nombre d'espèces du genre *Thymus* contenant le composé à une teneur de plus de 10%

Figure 4 : Composés des huiles essentielles du genre *Thymus* dans l'ordre de leur importance (76).

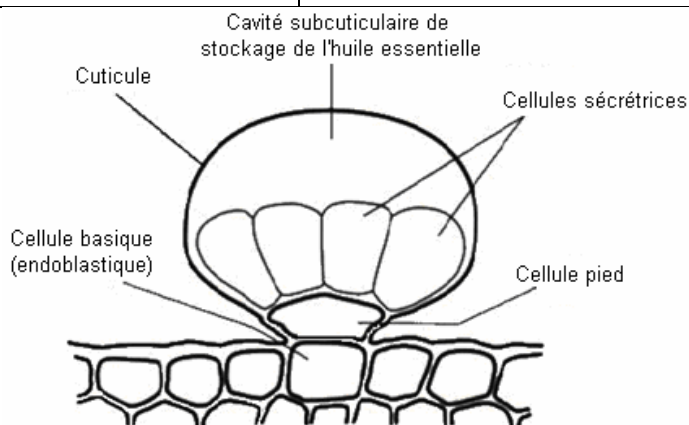
1.5. Biosynthèse

Dans la famille des Lamiaceae à laquelle appartiennent le thym et l'origan, les huiles essentielles sont stockées dans des trichomes glandulaires situés sur la surface épidermique sur les deux côtés des feuilles et sont caractérisés par une anatomie typique (Figure 5). **Bruni et Modenesi** ont intensivement étudié en 1983, les trichomes et suivi leur développement dans le thym (*Thymus vulgaris*), par microscopie électronique (113). On peut retenir de cette étude que les huiles essentielles sont produites par les cellules sécrétrices qui sont au nombre

de 10 à 14, puis stockées dans la cavité subcuticulaire. La cellule basique joue le rôle d'obstacle et permet l'écoulement de l'huile produite vers la cavité de stockage.

Tableau 3 : Exemples de chémotypes rencontrés dans les huiles essentielles du thym.

Chémotype	Teneurs en composés majoritaires	Espèces et références	Pays
Chémotype à 1,8-cinéole	1,8-cinéole (50-65%)	<i>T. albicans</i> Hoffmans et Link (114)	Portugal
Chémotype à α -terpinéol	α -terpinéol (30.6-40.5%)	<i>T. caespitatus</i> Brot. (115)	Portugal
Chémotype à carvacrol	Carvacrol 70.6%	<i>T. sepilloides</i> (116)	Espagne
Chémotype à Bornéol	Bornéol (41.2-43.7%)	<i>T. carnosus</i> Boiss. (117)	Espagne
Chémotype à linalool	Linalool 74.3%	<i>T. bracteatus</i> Lange ex Cutanda (118)	Espagne
Chémotype à p-cymène	p-cymène 50.6%	<i>T. zygis</i> L. (119)	Maroc
Chémotype à linalyl acétate	linalyl acétate 70%	<i>T. praecox</i> Opiz ssp. <i>Arcticus</i> (E. Durand) J alas (120)	Norvège
Chémotype à thymol	Thymol 71.8%	<i>T. zygis</i> L ssp. <i>gracilis</i> (Boiss.) Morales (121)	Espagne
Chémotype à géraniol	Géraniol 90%	<i>T. nitens</i> Lamotte (122)	France
Chémotype à terpinyl acétate	Terpinyl acétate (82.1%)	<i>T. longicaulis</i> C. Presl ssp. <i>longicaulis</i> (123)	Turquie
Chémotype à (E) Nerolidol	(E) nérolidol 48.4%, caryophyllène 14.8%	<i>T. albanus</i> ssp. <i>albanus</i> (124)	Macedoine

Figure 5: Anatomie d'un trichome glandulaire de thym (*Thymus vulgaris*) (76)

1.5.1. Biosynthèse des terpènes aromatiques

Les terpènes volatiles des plantes ont habituellement un caractère aliphatique. Il existe quelques exceptions seulement, par exemple : p-cymène, thymol, carvacrol, p-cymène-8-ol, cuminalcohol, calaménène. Par conséquent, le processus qui mène à l'aromatization du cyclohexane a toujours constitué un pôle d'intérêt. *Thymus vulgaris* a servi d'objet le plus important à l'élucidation de la voie biogénétique des terpènes aromatiques, étant donné que l'huile essentielle de thym est constituée, surtout par du thymol, carvacrol et p-

cymène. Ainsi, une attention particulière sera accordée à la biosynthèse de ces phénols tandis que la biosynthèse des monoterpènes et des sesquiterpènes sera abordée brièvement.

Tous les terpènes contiennent une séquence de deux ou plusieurs **unités isopréniques** (C_5H_8). Ils peuvent être considérés comme des polymères à 5 atomes de carbone (**2-méthyl 1,3-butadiène**) jointes « tête à queue » (la plus commune) ou « tête à tête » (moins commune) suivis par des transformations chimiques secondaires.

En fait, les unités qui constituent les composés terpéniques ne sont pas de vrais isoprènes, mais deux dérivés phosphorylés appelés : **isopentenyl diphosphate (IPP)** ou « isoprène actif » et son isomère le **diméthylallyldiphosphate (DMAPP)**. Deux voies de cette biosynthèse sont connues. La première voie appelée la « voie classique » (Fig. 6, colonne gauche) et la voie de l'**acétate/mévalonate** où 3 molécules d'acetyl-Coenzyme A (**Acetyl-CoA**), se condensent par l'intermédiaire des enzymes **acetyl-CoA acyltransferase** et **hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthase** pour donner le composé en C_6 le **HMG-CoA**. La réduction de ce dernier conduit à l'acide mévalonique (MVA), qui subit ensuite une phosphorylation (qui n'apparaît pas sur la figure 6) en deux temps qui utilise deux molécules d'ATP (Adinosine triphosphate), formant ainsi une molécule en C_6 , le mévalonate diphosphate (MVA-PP). Une décarboxylation transforme le MVA-PP en un composé en C_5 l'**isopentenyl diphosphate (IPP)** qui est le précurseur central de la biosynthèse des terpénoïdes.

A l'issue de différentes expériences il est apparu évident que l'isopentyl diphosphate (IPP) ne pouvait pas être le seul intermédiaire de la biosynthèse des terpènes et que l'IPP était un dérivé d'un ensemble d'intermédiaires glycolytiques. Par voie de conséquence, la voie du **pyruvate/glyceraldehyde-3-phosphate** a été introduite (Fig. 4, colonne gauche). L'étape initiale de cette voie implique une condensation de pyruvate avec le D-glyceraldehyde-3-phosphate pour donner le 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate suivi par une série d'étapes de réductions, de déshydratations et une phosphorylation qui mènent l'IPP ou le DMAPP comme produits terminaux. Jusqu'ici aucun intermédiaire à l'IPP n'a été identifié (125) (ces intermédiaires inconnus sont indiqués par un point d'interrogation sur la figure 6).

Chez les plantes, la formation d'IPP est compartimentée. La voie classique à l'acétate/ mévalonate dont les enzymes sont localisées au compartiment cytosolique, paraît produire le précurseur des triterpènes et des sesquiterpènes tandis que dans les plastides la voie du pyruvate/glyceraldehyde-3-phosphate (appelée aussi la voie du deoxyxylulose) produirait les monoterpènes, diterpènes et tétraterpènes (125). Plusieurs monoterpènes et sesquiterpènes ont cependant été trouvés porter les deux unités isopréniques provenant des deux voies (126).

Le couplage de deux unités isopréniques (IPP et DMAPP), mène à une molécule en C_{10} le géranyl pyrophosphate (GPP) qui sert de précurseur des monoterpènes dont les principaux qu'on trouve dans les huiles essentielles du thym sont représentés sur la figure 7. Le couplage d'une troisième unité isoprénique fournit le farnesyl pyrophosphate (FPP), le précurseur des sesquiterpènes à 15 atomes de carbone (127).

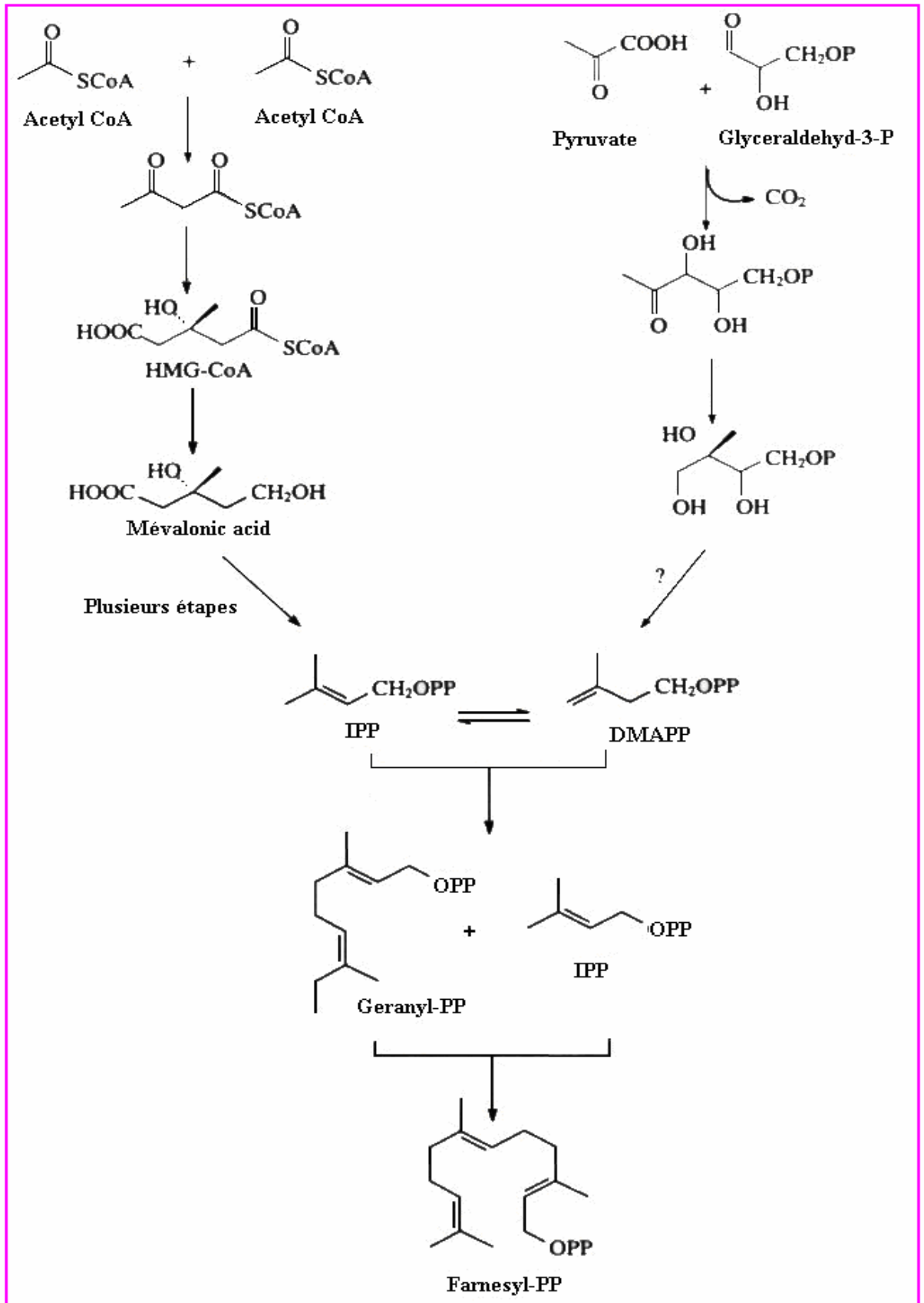


Figure 6: Biosynthèse des terpénoïdes. A gauche : voie classique (Voie acétate/mévalonate) ; à droite la voie pyruvate/glycéraldéhyde 3-phosphate (128, 129)..

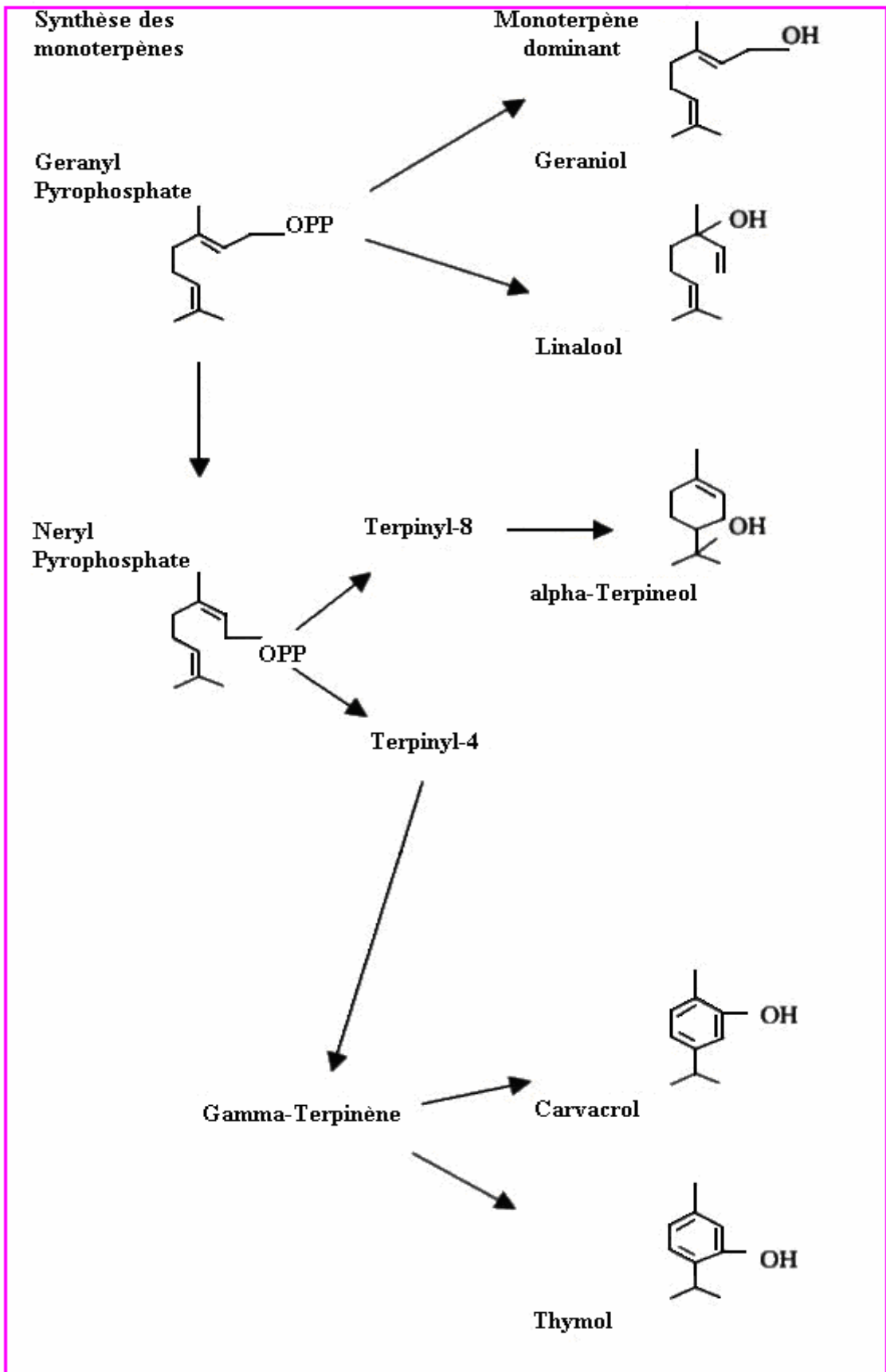


Figure 7 : Biosynthèse des principaux monoterpènes dans *T. vulgaris* (128, 129).

En 1964, il a été postulé que le γ -terpinène était le produit de départ de la biosynthèse des monoterpènes aromatiques, thymol et carvacrol entre autres, et que le p-cymène était le premier produit formé selon une aromatisation non enzymatique du γ -terpinène (122). Cette voie a été confirmée plusieurs années plus tard et il a été attribué au p-cymène le rôle d'intermédiaire clef, mais le processus non enzymatique a été démenti (Fig. 8).

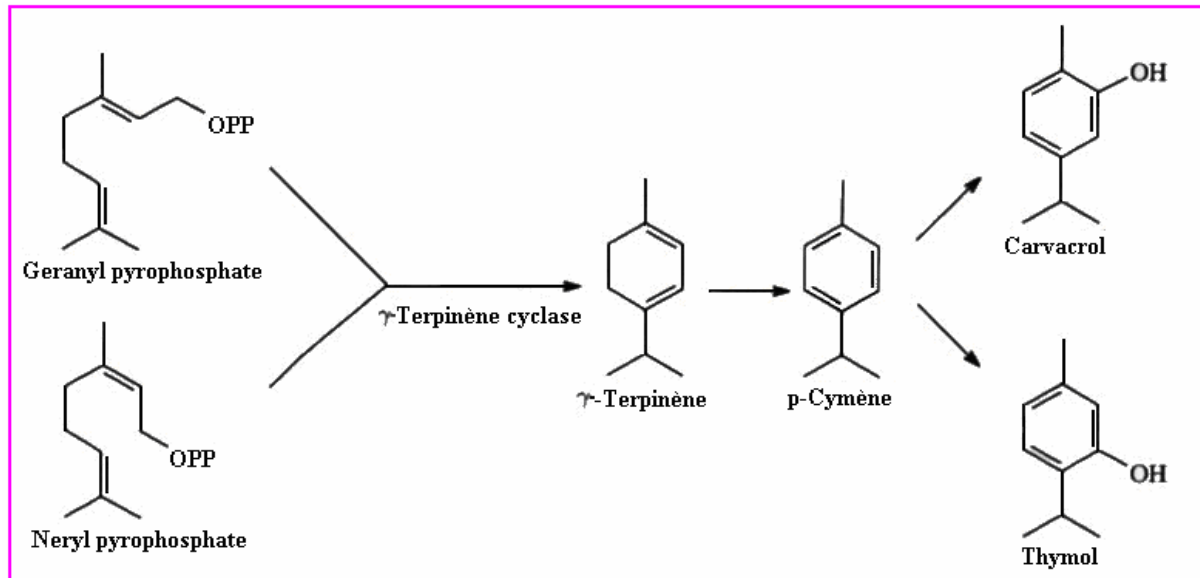


Figure 8 : Biosynthèse du thymol et du carvacrol (130)

1.6. Principales utilisations du thym

Le thym possède un large spectre d'utilisations, parmi lesquelles on peut citer :

- Confection de savons, parfums et détergents.
- Considéré comme une herbe médicinale avec une action antispasmodique, fluidifiante réduisant la flatulence.
- Son usage est très reconnu pour soulager les symptômes de la bronchite, inflammation des voies respiratoires, troubles gastro-intestinaux, traiter la stomatite, la laryngite et les blessures cutanées superficielles.
- L'herbe séchée est employée pour donner de la saveur à la viande, aux conserves et aux sauces.
- Le thym produit un miel distinctif.

2. L'origan

2.1. Historique et origine

Le genre *Origanum* comporte plusieurs espèces aromatiques de la famille des Labiées, il est originaire du sud est méditerranéen et d'Asie occidentale (131).

Le nom origan (Oregano en Anglais) dériverait de deux mots Grecs ; **Oros** : montagne ou colline et **Ganos** : ornement et signifie « parure de montagne », parce que cette plante préfère une altitude élevée dans le climat méditerranéen.

2.2. Caractéristiques botaniques

2.2.1. Classification

Le genre *Origanum* inclut des arbustes nains dicotylédones, des plantes annuelles, bisannuelles ou vivaces qui se reproduisent dans les secteurs chauds et montagneux.

D'après **Engler (1892-1926)**, l'origan appartient au :

Règne	: Plantae
Embranchement	: Spermaphytes
Sous embranchement	: Angiospermes
Classe	: Magnolipsida
Sous classe	: Métachlamydées
Ordre	: Tubiflorales
Famille	: Labiacées
Sous famille	: Stachyoideae
Genre	: <i>Origanum</i>

2.2.2. Description morphologique et biogéographie

Le genre *Origanum* est constitué de plantes herbacées ou sous-ligneuses à la base. Les inflorescences sont en épis, réunis eux même en inflorescences composées. Le calice est tubuleux à 5 dents courtes, bilabiées ou non. La corolle est blanche ou rosée, à lèvre supérieure émarginée et à lèvre inférieure trilobée (73).

La variation morphologique à travers le genre a mené à la distinction de **10 sections** consistant en **42 espèces** ou **49 taxons** (espèces, sous espèces et variétés) (132-134).

2.2.2.1. Répartition dans le monde

L'origan pousse dans de nombreux pays d'Europe et d'Asie (figure 9), notamment en Chine et en Inde (135). Cette plante vivace pousse surtout dans les pays méditerranéens. Ainsi, sur les **49 taxons** répartis à travers le monde, **46** d'entre eux sont répartis entre des pays du pourtour méditerranéen (figure 10). **21** des **49 taxons** se trouvent en Turquie, dont 12 sont endémiques à ce seul pays. Selon la WCMC (World Conservation Monitoring Center, Cambridge, United Kingdom), parmi les **49 taxons**, **13** espèces sont classées comme rares dont *O. floribudum* d'Algérie, 01 très rare (*O. bargyli* Mouterde) se trouvant en Turquie et en Syrie, 03 sont insuffisamment connues : *O. Boissieri* et *O.*

brevidens (Turquie), *O. syriacum* L. var. *bevanii* (Chypre, Syrie, Turquie, Liban), 03 sont rarissimes ou menacées d'extinction : *O. microphyllum* (Turquie), *O. Elongatum* et *O. grosii* (Maroc).



Figure 9 : Répartition géographique de l'origan dans le monde (136)

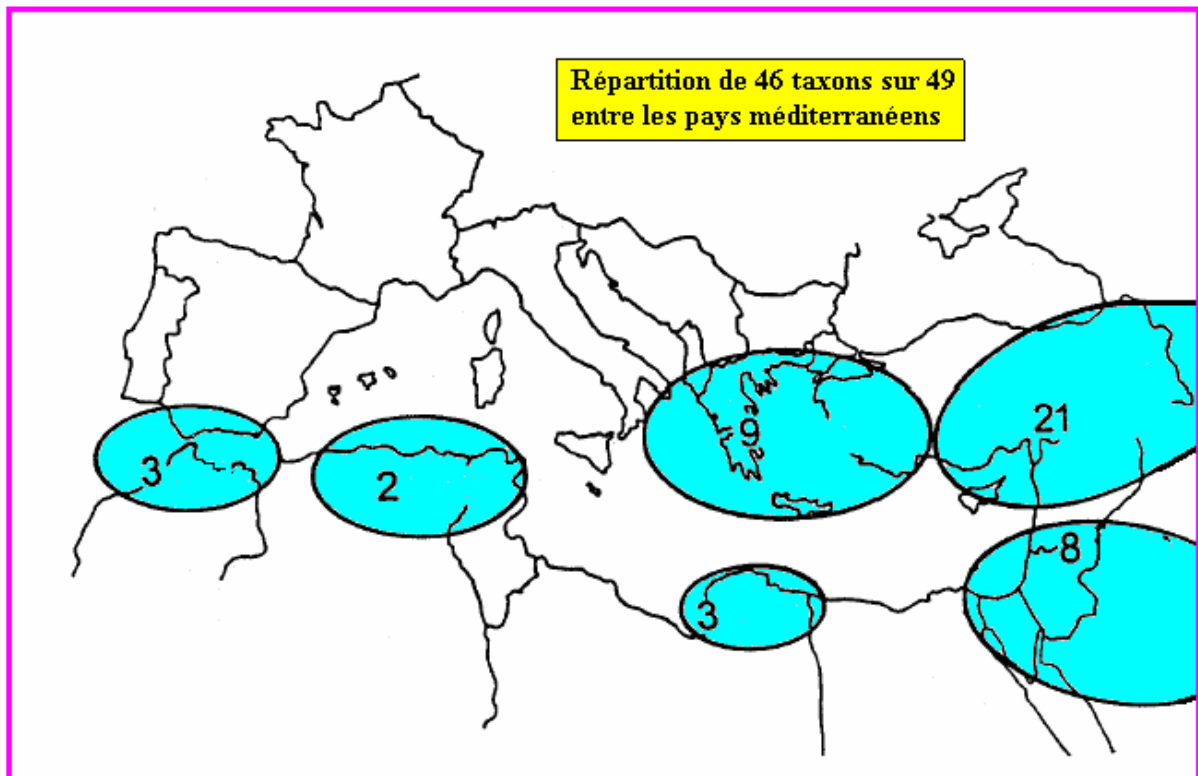


Figure 10 : Nombre de taxons poussant dans les différents pays méditerranéens (136).

2.2.2.2. Répartition en Algérie

L'origan est une plante répandue en Algérie, elle est appelée par le même nom que le thym : « *zaater* » et elle est représentée par deux espèces : *Origanum glandulosum* et *Origanum floribundum*. Cette dernière est d'ailleurs une espèce endémique Algérienne (73). Selon la révision taxonomique du genre établie par **Ietswaart** en 1980 (132), ces espèces appartiennent aux sections *O. vulgare* L. subsp. *glandulosum* et *Elongastipica*, respectivement (Tableau 4).

Tableau 4 : Répartition géographique des deux espèces d'origan en Algérie

Espèces	Section	Localisation et caractéristiques
<i>Origanum glandulosum</i> Desf.	<i>O. vulgare</i> L. subsp. <i>glandulosum</i> Desf.	<ul style="list-style-type: none"> - Commune dans tout le Tell. - Endémique Algéro-Tunisienne. - Pousse dans les garrigues et broussailles.
<i>Origanum floribundum</i> Mumby	<i>Elongastipica</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Espèce rare. Pousse dans la partie nord centrale (Kabylie, Médéa, Blida). - Endémique d'Algérie. - Pousse en pâturage et surtout en montagne.

2.3. Huiles essentielles de l'origan

Les huiles essentielles de l'origan varient tant du point de vue du rendement (volume/100g) que du point de vue composition. En se basant sur le rendement en huiles essentielles, les différents taxons du genre *Origanum* peuvent être distingués en trois groupes principaux (136) :

- Ø Espèces pauvres en huiles essentielles, avec un rendement inférieur à 0.5% (ml/100g de matière sèche), par exemple l'espèce endémique Grecque *O. calcaratum* (137).
- Ø Espèces avec un rendement variant entre 0.5 et 2%, par exemple l'espèce endémique à l'île de Crète, *O. microphyllum* (137).
- Ø Espèces riches en huiles essentielles avec des rendements supérieurs à 2%, telles que *O. glandulosum* d'Algérie avec 4.8% (138).

En se référant à la composition des huiles essentielles, les espèces d'origan peuvent être distinguées par la prédominance des composés suivants :

- Ø Linalool, terpinen-4-ol et sabinene hydrate. C'est le cas par exemple de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* (139).
- Ø Thymol et/ou carvacrol. C'est le cas de la plupart des espèces d'origan dont *O. Dictamus* (112) et *O. floribundum* (140).
- Ø Sesquiterpènes : cas de l'huile essentielle d'*O. vulgare* subsp. *vulgare* (141,142).
- Ø α -Terpineol : huile essentielle d'*O. cordifolium* (143).
- Ø Eucalyptol, α -terpineol et terpinen-4-ol : huile essentielle d'*O. dayi* (144).

2.4. Principales utilisations de l'origan

C'est l'un des aromates les plus populaires dans le monde. Cette plante est cultivée et commercialisée par plusieurs pays (Turquie, Albanie, Mexique, Italie, Maroc...). Indispensable à la pizza napolitaine, cet aromate est très prisé en Grèce où il est connu sous le nom de « Rigam ». Selon des estimations, plus de 300.000 tonnes d'origan sont consommées annuellement aux USA (145). Jusqu'à présent, il n'y a pas d'origan typique du point de vue qualité. Il est très utilisé en médecine traditionnelle, pour son effet antiseptique et anti-inflammatoire. Il fait intervenir la menstruation, soulage les maux de tête et de dents et aide à lutter contre les insomnies. C'est un bon stimulant de l'appareil digestif et il est surtout utile dans diverses affections des voies respiratoires. Dans le domaine de la recherche, l'origan est très expérimenté pour son activité antivirale, contre les nématodes ainsi que ses activités : biocide, antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire.

Chapitre III :

Oxydation et activité antioxydante

Chapitre III : Oxydation et activité antioxydante

1. Introduction

Lorsqu'ils sont extraits de leur contexte de protection naturelle, tous les corps gras (ou lipides ou matières grasses) subissent au cours de leurs conservation ou transformation des altérations de type oxydatif. L'autooxydation d'un corps gras est un phénomène purement chimique très complexe mettant en jeu des réactions radicalaires capables de s'auto-entretenir et qui ne nécessitent que la présence de l'oxygène atmosphérique. Les premiers produits instables sont des hydroperoxydes dont la structure va dépendre de la nature des acides gras attaqués. Les radicaux qui en dérivent par scission, conduisent à de multiples produits secondaires dont la nature et les proportions dépendent de plusieurs paramètres. Parmi ces produits, apparaissent des molécules volatiles (aldéhydes, hydrocarbures, cétones,...) qui engendrent des pertes considérables au niveau des qualités organoleptiques et nutritionnelles de la matrice qui les contient, avec l'apparition d'une saveur caractéristique «rance» modifiant ainsi la qualité marchande du produit et conditionne directement sa durée de vie. Pour limiter ces dégâts, la présence de produits à effets ralentisseurs (chélateurs de métaux, absorbeurs d'oxygène ...) de molécules dites antioxydantes serait indispensable.

Les radicaux libres sont directement impliqués dans les processus d'oxydation et induisent des dommages et des lésions sur l'ADN, les protéines cellulaires et les lipides membranaires. L'hyperproduction des radicaux libres ou stress oxydatif est à la base des explications physiopathologiques des grandes maladies dites neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et le vieillissement cérébral. La production de ces radicaux libres peut être limitée par des antioxydants (Scavengers = éboueurs) qui piègent ces radicaux libres (4).

2. Mécanismes généraux de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs (146) :

- l'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres ;
- la photo-oxydation, initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs ;
- l'oxydation enzymatique initiée par la lipoxygénase.

2.1. Auto-oxydation

L'oxygène moléculaire se fixe lentement, mais irréversiblement sur un certain nombre de molécules, notamment sur les doubles liaisons des acides gras insaturés avec pour conséquences :

- l'altération des propriétés organoleptiques et l'apparition du phénomène de « rancissement » dans les produits riches en lipides ;
- l'apparition de faux goûts dans certaines boissons, et notamment dans des vins et des bières ;
- un trouble colloïdal ;
- la destruction partielle des qualités nutritionnelles ;
- l'apparition de molécules dont certaines ne sont pas dénuées de toxicité ;
- la détérioration de certaines vitamines ;

- l'épaississement des huiles.

L'oxydation des lipides est une réaction auto-catalytique. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes. L'oxydation des acides gras insaturés commence, au cours d'une phase dite d'initiation, par arrachement d'un proton en α d'une double liaison avec la formation d'un radical libre (figure 11).

Puis les réactions s'enchaînent pour produire plusieurs radicaux libres (propagation) qui se combinent pour former des composés non radicalaires (terminaison).

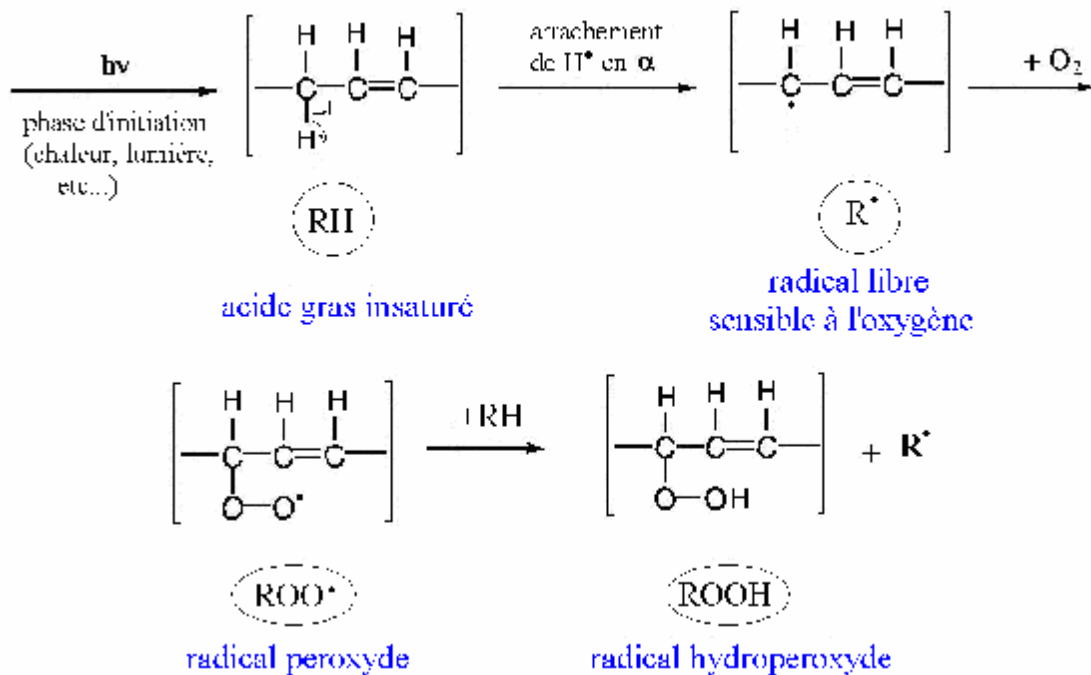
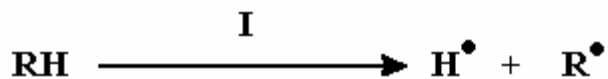


Figure 11 : Oxydation d'un acide gras insaturé (160).

2.1.1. Mécanisme réactionnel de l'oxydation des lipides

- **Initiation**

En présence d'un initiateur (**I**), les lipides insaturés (**RH**) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre (**R**) (radical, lipoyle).

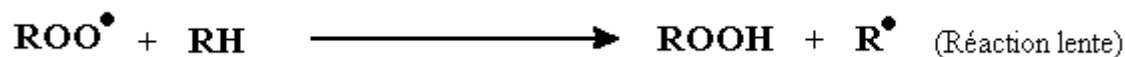
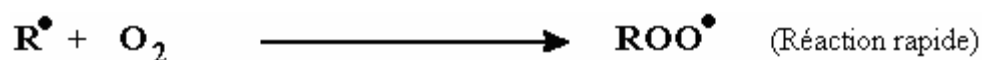


Cette phase d'autoxydation nécessite, ou du moins est accélérée, sous l'effet de la chaleur, d'une exposition à la lumière, d'une agitation, d'une élévation de température, des radiations ionisantes, des générateurs chimiques, des systèmes enzymatiques ou chimiques produisant des espèces activées de l'oxygène, ou de traces métalliques.

A ce stade, dit de peroxydation, la flaveur de rance peut ne pas être perceptible, la qualité marchande du produit non encore altérée.

- **Propagation**

Le radical libre formé fixe un atome d'oxygène en donnant un radical **peroxyde** instable (Réaction rapide) qui, par action d'une seconde molécule d'acide gras, conduit d'une part à un **hydroperoxyde**, d'autre part à un second radical libre (Réaction lente). Ce dernier réagit avec une autre molécule d'acide gras (propagation) et l'on aboutit à une suite de réactions radicalaires.



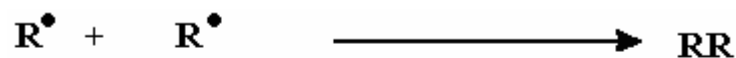
Les peroxydes sont peu stables et vont donner naissance, par coupure, à des produits secondaires volatiles (hydrocarbures, aldéhydes, cétones, acides, alcools, esters) et non volatils (éthers oxydes, époxydes, oxy-monomères/-dimères) qui sont responsables de la détérioration organoleptique comme le montre la figure 12.

Nous citerons l'exemple bien connu, de l'oxydation de l'acide linoléique qui, sous l'effet de l'oxygène de l'air, en présence de lipoxigénases et de lipases, se transforme en 2-trans-nonenal, composé qui donne à certains pains additionnés jusqu'à 7% de matières grasses, un goût de carton, de vieux papier.

Les hydroperoxydes peuvent également se décomposer par scission homolytique de la liaison O-O pour former un radical alcoyl et un radical hydroxyle. Le radical alcoyl réagit avec d'autres substrats et propage la réaction en chaîne. Il peut également subir une scission carbone-carbone de part et d'autre du radical pour former un radical alkyl et un radical vinyl. Le radical alkyl peut réagir avec un hydrogène, un radical hydroxyle ou une molécule d'oxygène générant ainsi des hydrocarbures, des alcools et d'autres hydroperoxydes. Le radical vinyl peut réagir avec un radical hydroxyle, un radical hydrogène ou l'oxygène moléculaire pour générer des aldéhydes et des hydrocarbures.

- **Terminaison**

La réaction s'achève d'elle-même lorsqu'il n'y a plus de molécules disponibles ou par recombinaison de deux radicaux libres entre eux pour conduire à un produit qui n'est pas un radical.



Le processus d'oxydation peut être interrompu par la présence d'antioxygènes qui interviennent comme « capteurs de radicaux libres ».

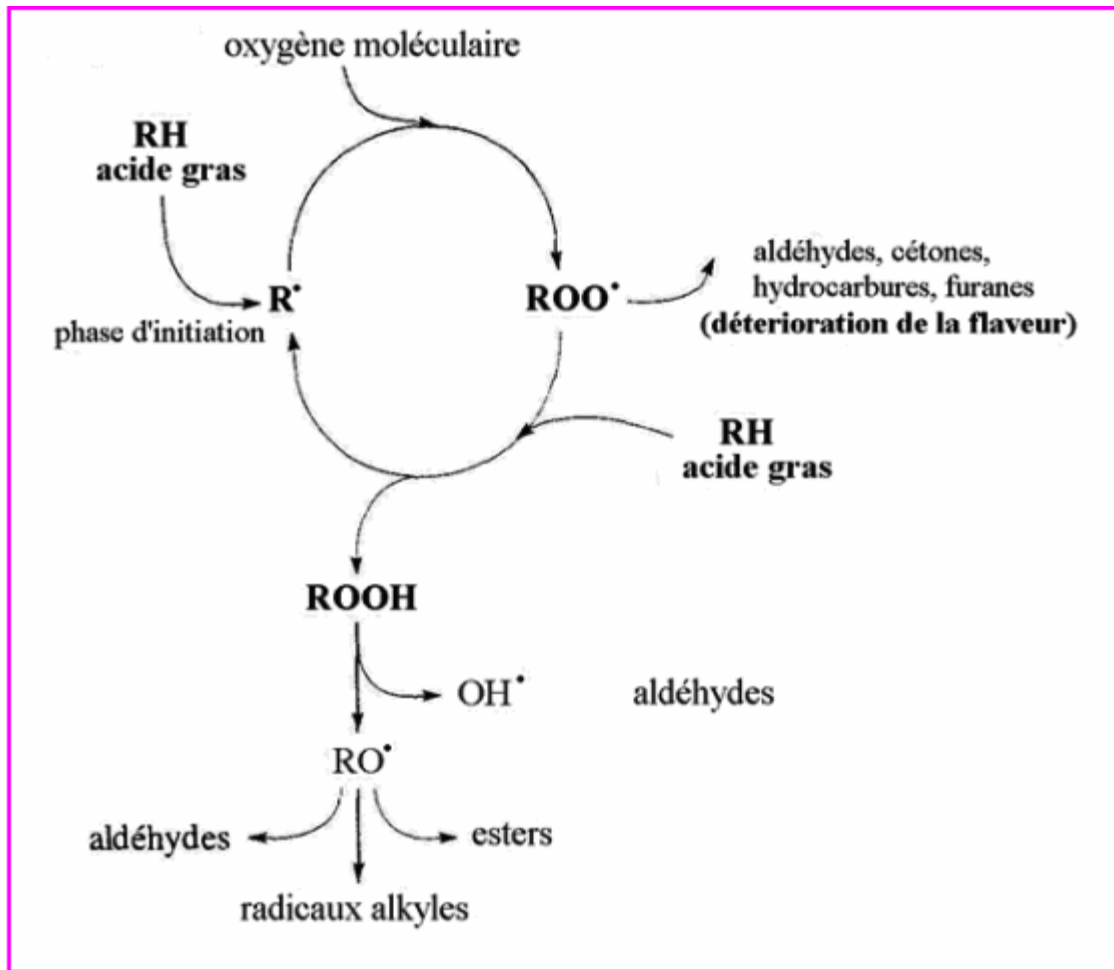
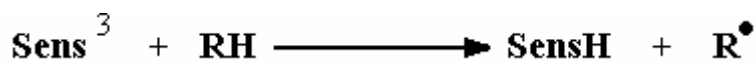


Figure 12 : Suite des réactions en chaîne conduisant à la détérioration organoleptique des acides gras insaturés (160).

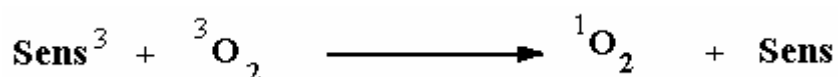
2.2. Photo-oxydation

La photo-oxydation est une voie importante de production d'hydroperoxydes en présence d'oxygène, d'énergie lumineuse et de photosensibilisateurs tels que les hémoprotéines ou la riboflavine (148). Les photosensibilisateurs (Sens) absorbent l'énergie lumineuse et passent à l'état triplet excité ($Sens^3$) (148). Les photosensibilisateurs interviennent dans l'oxydation des lipides selon deux types de mécanismes (3).

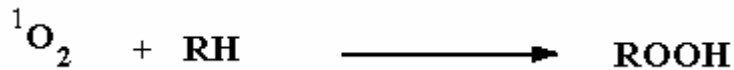
Les photosensibilisateurs de type I, telle que la riboflavine, agissent comme les radicaux libres initiateurs. Dans leur état triplet, elles arrachent un atome d'hydrogène ou un électron aux molécules lipidiques pour former un radical capable de réagir avec l'oxygène.



Selon le second mécanisme, les molécules photosensibles de type II, telles que la chlorophylle et l'érythrosine, réagissent dans leur état excité ($Sens^3$) avec l'oxygène triplet auquel elles transfèrent leur énergie pour donner de l'oxygène singulet (1O_2).



L'oxygène singulet ainsi formé est très électrophile et peut réagir directement sur un acide gras insaturé (RH) formant ainsi un hydroperoxyde ROOH.



Par la suite interviennent les réactions radicalaires en chaîne de l'auto-oxydation. Les hydroperoxydes ainsi formés sont différents de ceux formés par auto-oxydation (3).

2.3.Voie enzymatique

Le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés peut être d'origine enzymatique. Les deux enzymes principalement impliquées sont la lipoxygénase et la cyclooxygénase (148). La lipoxygénase catalyse l'insertion d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé selon une réaction stéréospécifique et aboutit à la formation d'hydroperoxydes.

Elle agit spécifiquement sur les acides gras non estérifiés. Son activité est donc souvent couplée avec celle des lipases et phospholipases (Figure 13). La cyclooxygénase est une lipoxygénase qui incorpore deux molécules d'oxygène au niveau d'un acide gras pour former des hydroperoxydes spécifiques (146).

L'oxydation enzymatique se produit même à basse température. Durant le stockage à l'état congelé l'activité enzymatique est très faible. Cependant, une fois la décongélation amorcée et des températures de 0°C à 4°C atteintes, il semblerait que cette activité reprenne et s'accroisse (3).

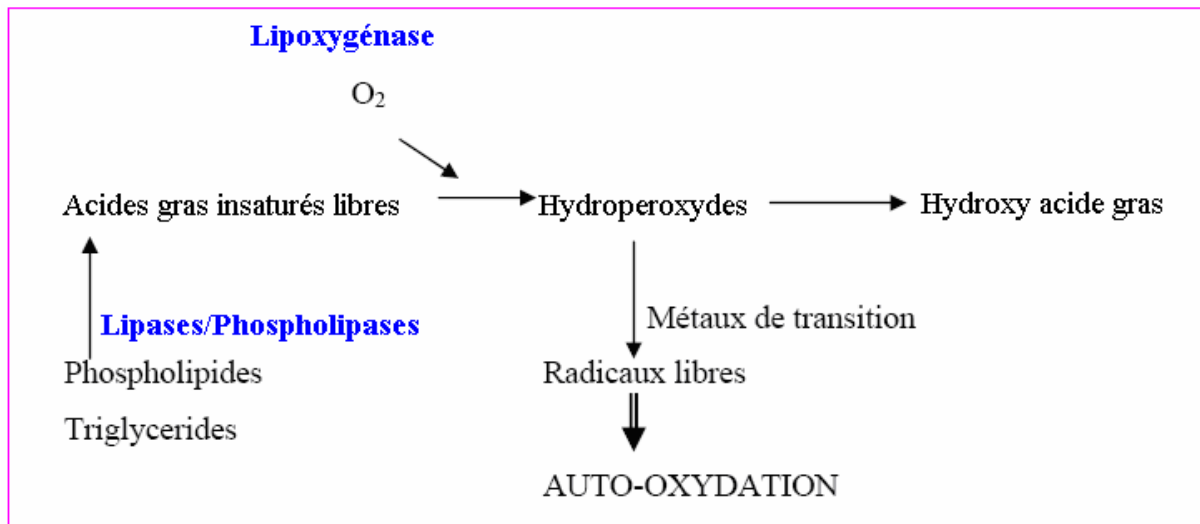


Figure 13 : Mécanisme d'initiation de la peroxydase des lipides par l'activité lipoxygénasique (149)

3. Les initiateurs de l'oxydation des lipides

La phase d'initiation de l'oxydation des lipides peut être déclenchée par plusieurs facteurs : les formes activées de l'oxygène, les enzymes, les métaux ou la chaleur (3, 148, 150).

3.1. Initiation par les formes activées de l'oxygène

L'oxygène moléculaire est, dans son état fondamental, à l'état triplet. Il ne peut réagir directement avec les lipides car la barrière de spin est trop élevée. La réaction de l'oxygène avec les acides gras insaturés est rendue possible par trois types de mécanismes (146).

Le premier correspond aux voies de l'autoxydation qui résultent du départ d'un hydrogène d'une chaîne d'acide gras sous l'influence de différents initiateurs comme les ions des métaux de transition, et les formes activées de l'oxygène comme le radical hydroxyle (OH[•]). Le radical hydroxyle est très réactif, il peut arracher un hydrogène et former ainsi un radical alkyle qui va initier la peroxydation lipidique.

Le second mécanisme est la formation d'oxygène singulet capable de réagir directement avec les chaînes grasses. C'est ce qui se produit généralement lors de la photooxydation.

La troisième est liée à l'intervention d'enzymes permettant une fixation directe de l'oxygène moléculaire.

3.2. Initiation par les métaux

Les métaux de transition jouent un rôle important dans la génération des radicaux libres de l'oxygène, ils sont les premiers activateurs des molécules d'oxygène (151). Au sein des tissus biologiques, les principaux métaux de transition présents sont le fer et le cuivre. Ces derniers catalysent l'oxydation des lipides par des voies enzymatiques et non enzymatiques.

La voie non enzymatique intervient en présence d'agent réducteur tel que les superoxydes, l'ascorbate et la cystéine (152).

En présence des métaux de transition, les hydroperoxydes produits par les enzymes, seraient décomposés pour former des composés volatils responsables des mauvaises odeurs.

L'initiation de l'oxydation lipidique par les métaux peut se faire par transfert d'électron ou par formation de complexe de transition ou de complexe avec le peroxyde d'hydrogène qui catalysent l'auto-oxydation et la décomposition par la réaction redox (3).

3.3. Facteurs environnementaux

Les principaux facteurs impliqués dans l'oxydation des lipides au cours des procédés de transformation et de conservation des produits alimentaires sont : la température, le pH, l'activité de l'eau et la pression partielle en oxygène.

3.3.1. La température

Une élévation de température favorise l'oxydation des lipides. L'oxydation des lipides est d'autant plus rapide que la température est importante : le départ des hydrogènes allyliques et la décomposition des hydroperoxydes en produits secondaires sont favorisés. Il est à noter cependant, que la solubilité de l'oxygène diminue quand la température augmente. Il existe donc un antagonisme entre ces deux paramètres (146).

A basse température, la solubilité de l'oxygène est élevée: la température devient alors le facteur limitant de la peroxydation lipidique. Au contraire, à température élevée, la concentration en oxygène dans le milieu est limitée, elle peut alors devenir un facteur limitant de l'oxydation. (153).

Au contraire, la congélation est un bon moyen pour augmenter la durée de conservation des produits (154), car les vitesses d'oxydations des lipides sont notablement réduites à faibles températures.

3.3.2. Le pH

Le pH influence le déroulement de l'oxydation par le biais de plusieurs mécanismes (154). Premièrement, pour les réactions d'oxydo-réduction faisant intervenir des protons (H^+) le potentiel redox décroît linéairement avec le pH.

Un pH acide favorise donc la réaction d'oxydation, en particulier quand des espèces pro-oxydantes (ions des métaux de transition) solubles en phase aqueuse sont présentes.

Il intervient également dans la solubilité des composés impliqués dans l'initiation de la réaction. Ainsi, plus le pH est bas, plus la solubilité et le potentiel redox de ces ions métalliques, et donc leur réactivité vis à vis des molécules oxydables est élevée (146).

3.3.3. L'activité de l'eau

Par définition l'activité de l'eau, est le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau d'un produit sur la pression partielle de la vapeur d'eau saturante exercée par l'eau pure à la même température.

L'activité de l'eau d'un système influence les réactions d'oxydation des lipides. L'effet de l'eau est lié aux propriétés de solvation des ions et des radicaux libres et à son activité chimique.

Par solvation, l'eau permet la mobilisation des substances pro-oxydantes ou antioxydantes. Elle interagit avec les cations métalliques et les rend plus ou moins disponibles dans la catalyse des réactions d'oxydation (146).

Une très faible activité de l'eau est également favorable à l'oxydation. Par contre, les réactions initiées par des activités enzymatiques sont généralement fortement ralenties quand l'activité de l'eau est inférieure à 0,7 (3).

3.3.4. L'oxygène

La concentration d'oxygène (pression partielle en oxygène) dans l'espace environnant le produit et dans le produit lui-même influence la vitesse d'oxydation.

Elle intervient également au niveau de la nature des produits secondaires formés par décomposition des hydroperoxydes. Son incidence est donc à la fois sur la durée de conservation du produit et la nature des odeurs perçues quand le produit est oxydé (146).

4. Les antioxygènes

Comme leur nom l'indique, les antioxygènes sont des substances intervenant dans les processus d'oxydation des produits alimentaires dans le but d'empêcher ou de freiner l'action de l'oxygène moléculaire. Les antioxydants sont des substances qui, ajoutées à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, sont capables de supprimer, empêcher ou retarder les processus d'oxydation en augmentant le temps au bout duquel il y a une altération décelable du produit (155).

L'utilisation d'agents antioxydants est ancienne et a été pratiquée depuis longtemps de façon empirique. On s'est aperçu que certains végétaux étaient capables de retarder la détérioration des aliments à l'air (effet protecteur du bourgeon du peuplier, du bois de chêne, de la sauge, du romarin). La branche de romarin introduite dans l'huile d'olive n'a pas qu'un effet décoratif, elle protège également de l'oxydation. Parmi les molécules actives, on retrouve de nombreux composés phénoliques dont l'action antioxydante peut s'écrire suivant les réactions décrites sur la figure 14.

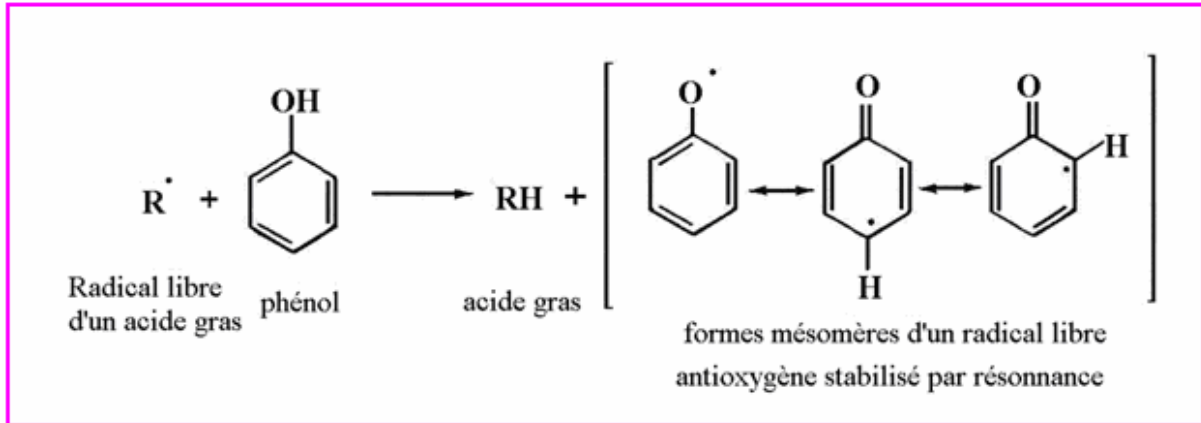


Figure 14 : Stabilisation d'un radical libre d'acide gras par un composé phénolique

Le phénol ou tout composé phénolique, fonctionne comme un accepteur de radicaux libres, bloquant ainsi la phase initiale d'oxydation. Pour qu'un antioxydant soit efficace, il faut qu'il soit ajouté tout au début avant que ne soit amorcée la suite réactions en chaîne. En pratique, on l'ajoute en fin de fabrication avant le conditionnement.

Il existe deux grandes familles d'antioxygènes, ceux d'origine naturelle et ceux de synthèse.

4.1. Antioxydants d'origine naturelle

Les sources d'antioxydants naturels sont nombreuses et variées : extraits d'herbes ou de végétaux (terrestres et marins), de fruits, de légumes, poudre de miel...(156).

L'acide ascorbique et ses sels : La notion de naturel est ici arbitraire, puisque l'acide ascorbique ou vitamine C est produit par synthèse, ainsi que ses sels. La vitamine C est très répandue dans la nature. Tous les végétaux en contiennent en quantités variables. On en trouve également dans les produits animaux. Elle a un caractère acide et intervient dans les échanges d'oxydo-réduction grâce à sa fonction ène-diol (fig 15)

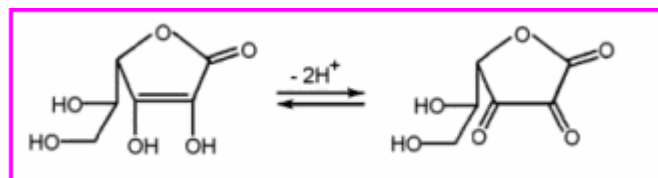


Figure 15 : Acide ascorbique

Son oxydation en acide déhydro-ascorbique est favorisée par la présence de cations divalents des métaux de transition (notamment fer et cuivre). C'est un antioxygène, acidifiant, séquestrant (chélateur) et renforçateur de goût.

Extraits naturels riches en tocophérols : Les tocophérols sont apparentés à la vitamine E et constituent un mélange concentré de tocophérols obtenus à partir d'huiles végétales comestibles ou de leurs sous-produits. La vitamine E est le terme collectif pour des composés qui présentent l'activité biologique de l' α -tocophérol (figure 16).

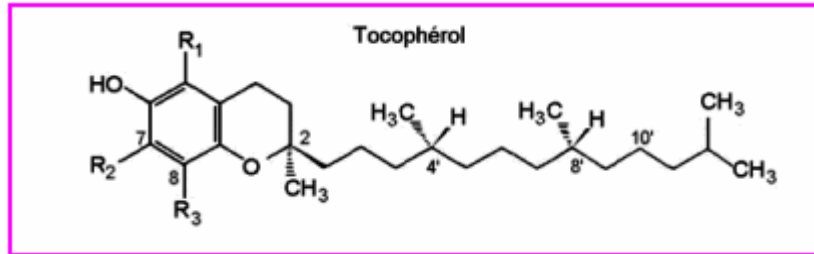


Figure 16 : Structure de l' α -tocophérol

Composés phénoliques extraits de végétaux : Les principaux végétaux riches en composés phénoliques à activité antioxydante sont le clou de girofle, le gingembre, le curcuma et la vanille (figure 17) (160).

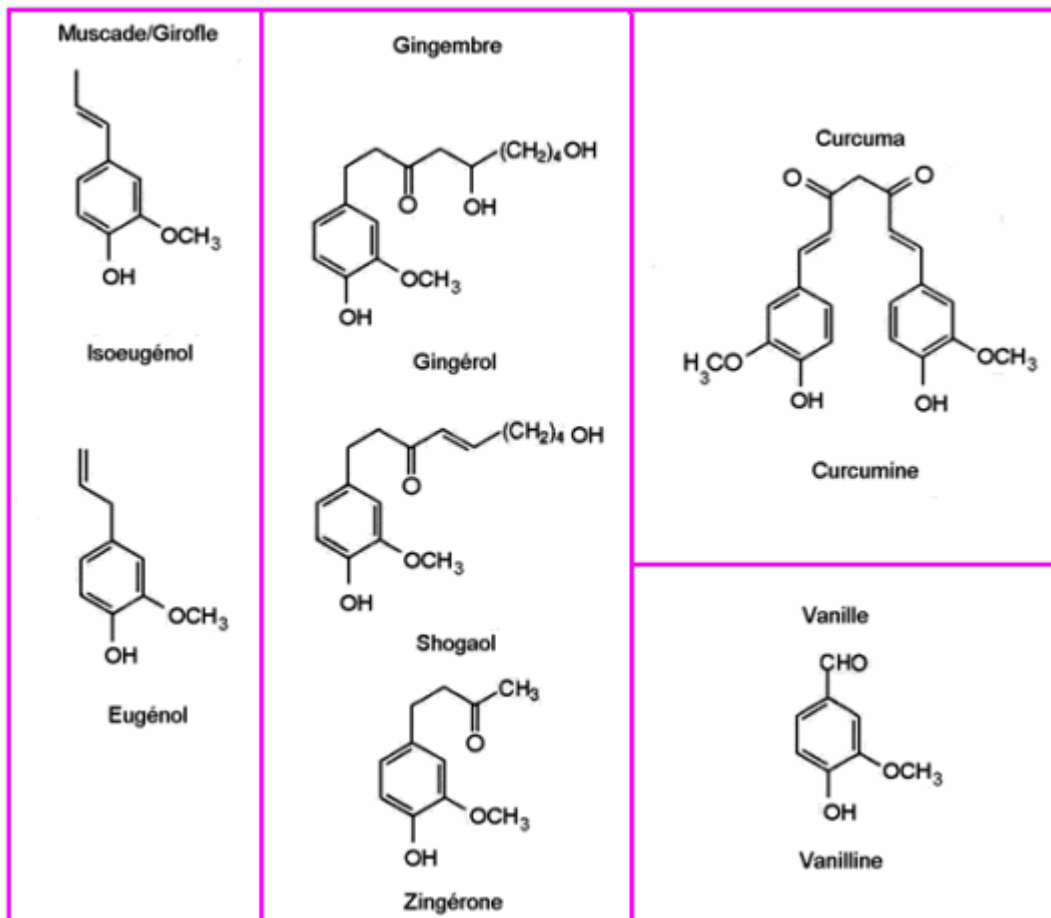


Figure 17 : Composés phénoliques à activité antioxydante dans certaines épices

L'activité antioxydante est encore plus importante avec les composés du thym et de l'origan, et surtout de la sauge et du romarin (figure 18). Ainsi, les extraits de romarins sont autorisés aux Etats-Unis (160).

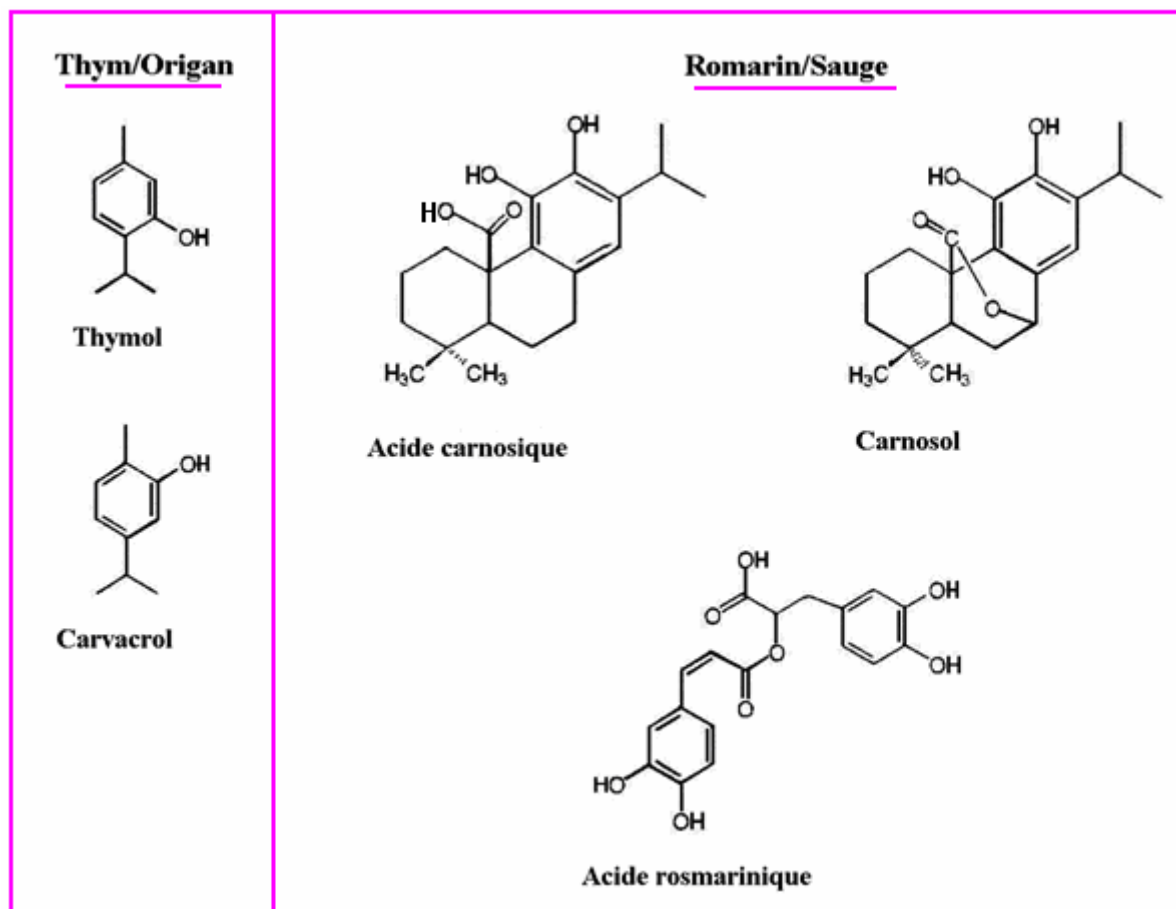


Figure 18 : Composés phénoliques extraits du thym et de l'origan, du romarin et de la sauge

D'autres antioxydants d'origine végétale tels que les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène (famille des caroténoïdes), l'acide caféique et la quercétine (famille des polyphénols) (Figure 19). Caroténoïdes et polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique mais d'une manière moins efficace semble-t-il que ne le fait l' α -tocophérol. En résumé on peut dire que d'une manière générale, les molécules actives sont soit des flavonoïdes (quercétine, myricétine,...), soit des dérivés de l'acide benzoïque (acide vanillique, acide syringique,...) soit des dérivés de l'acide cinnamique (acide caféique, acide rosmarinique, ...) ou des composés phénoliques (thymol, carvacrol, ...) (183).

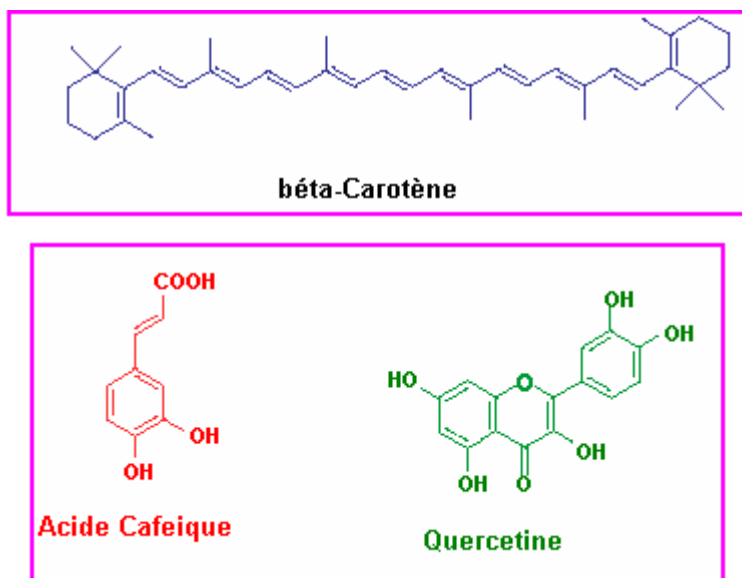


Figure 19 : Antioxydants de la famille des caroténoïdes (β -carotène) et de la famille des polyphenols (acide caféique et quercetine)

4.2. Antioxydants de synthèse

Les principaux antioxydants de synthèse sont représentés sur la figure 20. Le **BHA**, ou butyl-hydroxy-anisole est un mélange de deux isomères qui auraient des propriétés carcinogènes chez le rat et le hamster. Il s'agit comme le BHT, d'un additif controversé. Le **BHT**, ou butyl-hydroxy-toluène ou hydroxytoluène butylated a une structure voisine de celle du BHA. Les études toxicologiques ont démontré, comme pour le BHA, qu'il peut agir au niveau du métabolisme énergétique et lipidique du foie, du poumon, de la coagulation sanguine. Il peut jouer un rôle dans le développement des tumeurs et provoquer des réactions allergiques.

Les principales utilisations du BHA et du BHT sont : pommes de terre déshydratées en flocons, huiles essentielles, matières grasses, margarines, beurres, gommages à mâcher.

Le TBHQ ou ter-butyl-hydroxy-quinone et l'étoxyquine sont autorisés aux Etats-Unis mais interdits dans les pays de l'Union Européenne. Le TBHQ s'oxyde rapidement sous l'effet de l'air pour donner le ter-butyl-quinone.

Parmi les autres antioxydants de synthèse on peut citer : l'anhydride sulfureux et les sulfites, l'acide érythroborique et l'érythroborate de sodium, le palmitate d'ascorbyle...

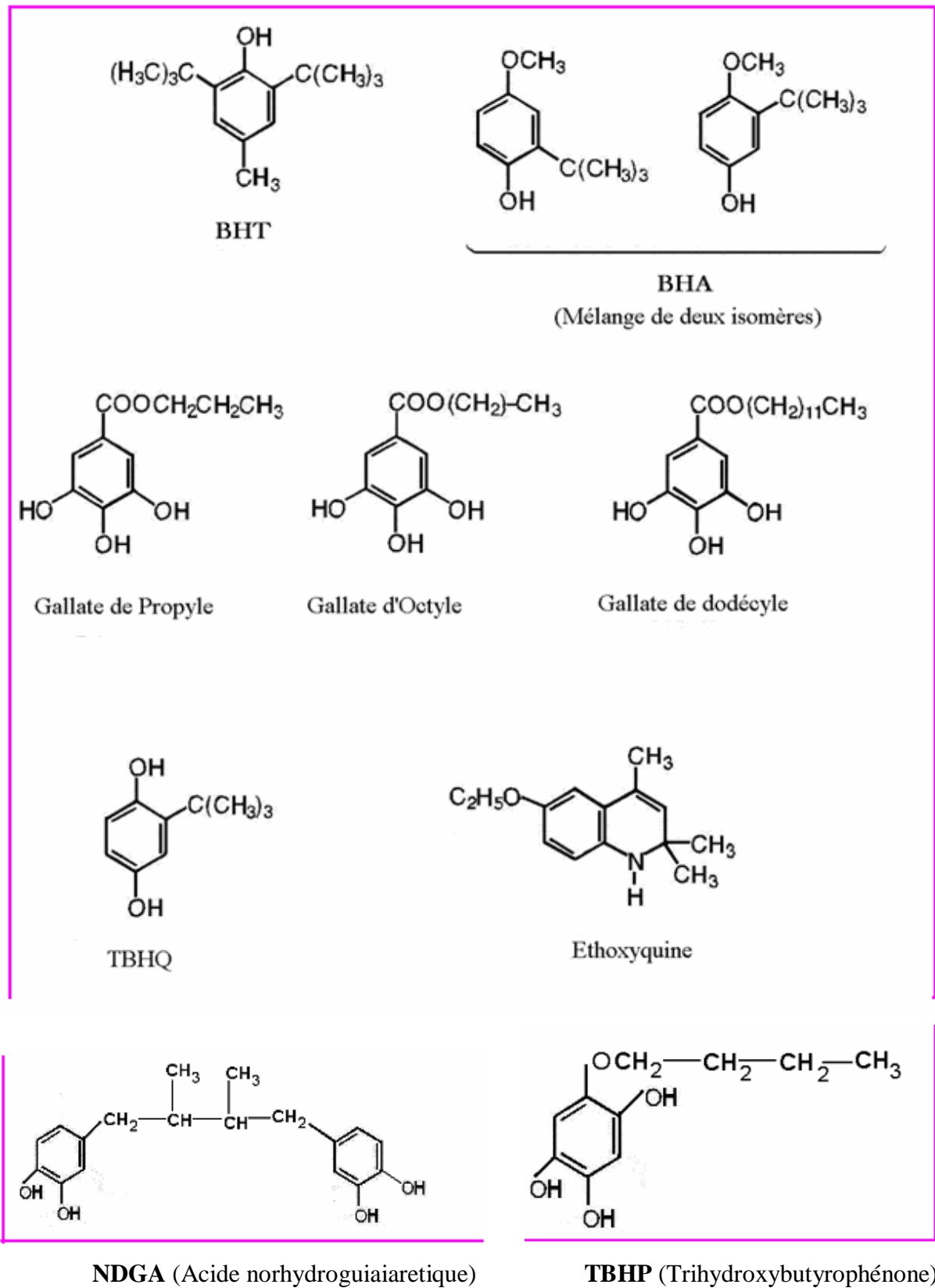


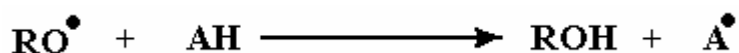
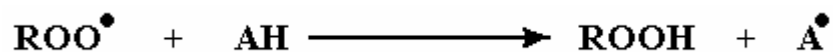
Figure 20 : Principaux antioxydants de synthèse utilisés dans l'industrie agroalimentaire

4.3. Classement des antioxydants selon leurs mécanismes d'action

Les antioxydants peuvent aussi être classés selon leurs mécanismes d'action :

4.3.1. Les antioxydants de type I

L'action des antioxydants de type I repose sur leur capacité à inactiver les radicaux libres. Ils inhibent la propagation des réactions radicalaires en fournissant des hydrogènes aux radicaux libres présents (10).



(AH : antioxydant et A[•] : radical de l'antioxydant)

Les radicaux A[•] sont stables et ne possèdent pas l'énergie suffisante pour arracher un hydrogène aux lipides, la propagation s'arrête alors. Les composés phénoliques naturels : tocophérols, ou de synthèse : butyl-hydroxy-toluène (BHT) appartiennent à cette classe d'antioxydants (157).

4.3.2. Les antioxydants de type II

Ce type d'antioxydant prévient la formation des radicaux libres et peut intervenir par différents mécanismes. Certains chélatent les ions métalliques réduisant l'effet pro-oxydant des ions, c'est le cas des acide phosphorique et citrique, lécithines (155). L'acide ascorbique a une activité antioxydante à des concentrations supérieures à 0,5 % tandis qu'il possède un effet pro-oxydant à faible concentration : 0,02-0,03 % (158).

Les flavonoïdes (un énorme potentiel antioxydant naturel) rentrent dans cette catégorie d'antioxydants. Ils agissent en piégeant les radicaux libres et en complexant les métaux pro-oxydants (159).

4.3.3. Les antioxydants de classe III

Ils regroupent les facteurs de l'environnement qui ont une action antioxydante en agissant sur le potentiel redox du milieu, la température, la pression en oxygène, la lumière.

L'emballage des produits permet ainsi de minimiser l'exposition à l'air et à la lumière. La mise sous vide permet de limiter les réactions d'oxydation et donc de prolonger la durée de vie des produits. L'emballage peut également être réalisé sous atmosphère modifiée (azote ou CO₂) (146).

4.3.4. Les agents synergiques

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection.

L'efficacité des antioxydants peut être augmentée par l'utilisation d'un mélange d'antioxydants de type I et II. L'association de ces deux types d'antioxydants permet d'inhiber les phases d'initiation et de propagation de l'oxydation des lipides (3).

4.4. Enzymes comme antioxydants

Une question qui se pose actuellement est l'utilisation des enzymes comme antioxydants. En effet, elles agissent en provoquant trois types de réaction :

- l'élimination de l'oxygène,
- l'élimination des espèces de l'oxygène actif appelés aussi les espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme les radicaux peroxyde et superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).
- la réduction des hydroperoxydes des lipides.

Cette utilisation n'est pas autorisée dans l'UE (union Européenne). La stabilité des enzymes en présence de lipides est difficile à prédire et on estime que des recherches sont nécessaires dans ce domaine (160).

5. Tests de mesure de l'activité antioxydante et de l'état d'oxydation

Les radicaux libres sont connus pour prendre une part importante à la peroxydation des lipides. Ils sont aussi impliqués dans le vieillissement, les maladies cardiovasculaires, les diabètes, la maladie d'Alzheimer et le cancer dans les organismes vivants ainsi que diverses maladies chroniques (4).

De nombreux substrats et systèmes de compositions différentes et de nombreuses méthodes analytiques sont employés dans les tests d'évaluation de l'efficacité des antioxydants. Ceci est évident du fait que plusieurs méthodes sont nécessaires pour évaluer des effets antioxydants différents.

L'efficacité d'un antioxydant est évaluée par sa capacité d'inhibition de l'oxydation d'un substrat approprié. Après avoir oxydé le substrat sous des conditions standard, l'étendue ou l'importance de l'oxydation (état final) est mesurée par des méthodes chimiques, instrumentales ou sensorielles. Les principaux traits de n'importe quel test sont : un substrat approprié, un initiateur d'oxydation et une mesure appropriée du point ou de l'état final. La combinaison du substrat, de l'initiateur et du point final qui ont été utilisés sont très nombreux. Aussi, pour les mêmes techniques analytiques, plusieurs stratégies analytiques sont possibles (161, 162).

On peut classer les tests de mesure de l'activité antioxydante dans les aliments et les systèmes biologiques dans deux groupes (figure 21) :

- Ø Ceux utilisés dans l'évaluation de la **peroxydation des lipides** et dans lesquels le substrat utilisé est un lipide ou une lipoprotéine sous des conditions standard et où l'inhibition de l'oxydation est mesurée (163).
- Ø Ceux utilisés dans la mesure du **pouvoir de piégeage** des radicaux libres (Scavenging of free radicals).

On rencontre parfois aussi, des tests de mesure des pouvoirs chélateur et réducteur de métaux qui sont des initiateurs de l'oxydation lipidique.

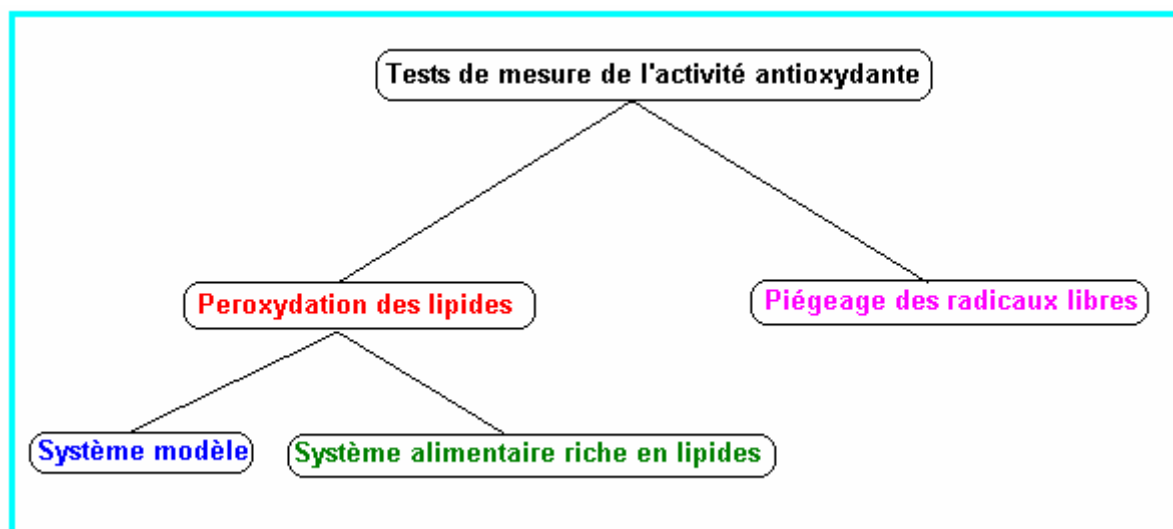


Figure 21 : Tests de mesure de l'activité antioxydante

Gray affirmait en 1978, qu'il n'y avait pas de méthode idéale bien corrélée aux changements organoleptiques se produisant au cours des réactions d'oxydation ; cette affirmation semble être encore vraie aujourd'hui, bien que l'on recense des dizaines de méthodes différentes (270).

Il ne faut pas confondre la mesure de l'**état d'oxydation** des lipides *in situ*, dans un aliment conservé dans les conditions normales de stockage ou de distribution, et la mesure de la **résistance à l'oxydation** évaluée par des tests prédictifs du rancissement qui mettent en jeu un **vieillessement accéléré** au moyen d'une oxygénation intensive, d'un traitement thermique et/ou d'une initiation forcée. En effet, les phénomènes naturels d'oxydation sont des processus lents, se déroulant souvent sur plusieurs mois, ce qui est incompatible avec le contrôle de qualité en milieu industriel. Les tests accélérés ont donc pour objectif d'apporter à l'utilisateur de matières premières une estimation rapide de la stabilité présumée de la matière grasse ou de l'efficacité théorique de tel ou tel antioxydant, seul ou en mélange. La plupart des méthodes permettant d'évaluer l'état d'oxydation d'un produit ou d'une matière grasse sont réalisés dans des conditions d'oxydation forcée. Les méthodes les plus couramment utilisées sont :

5.1. L'indice de peroxyde : la méthode AFNOR T60-220 consiste à réduire les peroxydes à l'aide de l'iodure de potassium, qui s'oxyde lui-même en iode que l'on détermine ;

5.2. Le test de SWIFT ou AOM (*active oxygen method*) : c'est un test accéléré qui consiste à faire barboter de l'air dans la matière grasse à 98 °C. On détermine ensuite l'indice de peroxyde ;

5.3. L'indice TBA – IUPAC 2.531 : le test de l'acide thiobarbiturique est l'un des plus utilisés. Cet acide réagit avec les produits de l'oxydation en donnant un pigment qui absorbe à 532 nm ;

5.4. L'indice de p-anisidine (IpA) – IUPAC 2.504 : les composés aldéhydiques α -insaturés oxydés réagissent avec la p-anisidine pour former un complexe coloré qui absorbe à 530 nm ; ce test est souvent associé à l'indice de peroxyde.

5.5. Le RANCIMAT : il s'agit d'un test d'oxydation accéléré où l'on fait buller, dans la matière grasse chauffée à haute température, un courant d'air. Le gaz qui sort et qui transporte les produits d'oxydation, est recueilli dans un bain d'eau distillée dont on mesure en continu la conductivité ;

5.6. L'analyse sensorielle : c'est la mesure la plus sensible mais elle présente des inconvénients. Reconnaître et quantifier les mauvais goûts nécessite un long apprentissage, car la sensation perçue n'est pas unique et se modifie au fur et mesure que l'oxydation progresse. En outre, la sensibilité de chaque individu diffère.

5.7. Autres méthodes

Parmi les méthodes exploratoires ou plus modernes, on peut citer :

5.7.1. La calorimétrie différentielle, à des températures de 80 à 140 °C et sous flux d'oxygène, pour évaluer le temps d'induction correspondant à la formation rapide d'hydroperoxydes (164).

5.7.2. la chimiluminescence, où l'on mesure les photons produits lors de la transition des électrons de l'état excité à l'état fondamental, au cours de la formation des peroxydes. En présence d'antioxydant, la quantité de lumière détectée est toujours plus faible (165).

5.7.3 La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) : elle permet de doser séparément les hydroperoxydes produits (166). On travaille en phase inverse, avec un détecteur ampérométrique.

5.7.4. La thermolyse : on analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG), les produits volatils formés par thermodécomposition des hydroperoxydes (167).

5.8. Mesure des pouvoirs chélateur et réducteur

Nous avons indiqué précédemment que les métaux de transition jouent un rôle important dans la génération des radicaux libres de l'oxygène et qu'ils sont les premiers activateurs des molécules d'oxygène. Les principaux métaux de transition présents au sein des tissus biologiques sont le fer et le cuivre. Ces derniers catalysent l'oxydation des lipides par des voies enzymatiques et non enzymatiques. Ainsi, parmi les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante on rencontre la mesure des pouvoirs chélateur et réducteur des métaux.

5.9. Mesure du pouvoir antioxydant en systèmes modèles

Pour procéder à un rapide balayage des potentialités antioxydantes de composés chimiques ou d'extraits de composition connue ou inconnue ou pour étudier les mécanismes d'action des molécules à activité antioxydante, des systèmes simples ou systèmes modèles (acide linoléique par exemple) et des tests rapides sont nécessaires. Toutefois, la valeur du classement des espèces chimiques ou des préparations (huiles essentielles et autres extraits par exemple), en fonction de leur efficacité théorique, reste limitée aux conditions opératoires mises en œuvre, toute extrapolation à des systèmes ou milieux complexes (produits alimentaires ou cosmétiques) nécessite des études supplémentaires.

Oxydation forcée d'un acide gras

Plusieurs auteurs ont utilisé l'oxydation forcée de l'acide linoléique en milieu émulsionné comme système modèle (107, 169-174). Pour éviter le chauffage intense, la chaîne de réactions de l'acide gras insaturé

peut être accélérée par un initiateur radicalaire tel le 2,2'-azobis(2,4-diméthyl-valéronitrile) (175) ou le 2,2'-azobis(2-aminodipropane) dihydrochloride (ABAP) (176) ou encore un pro-oxydant renfermant des ions ferriques, l'hémoglobine par exemple (177). La plupart des oxydations accélérées se passent en milieu émulsionné (tampon+ Tween), où l'on suit la consommation d'oxygène ou la disparition de l'acide gras.

5.9.1. Oxydation en milieu membranaire et liposomes

De nombreux chercheurs ont modélisé les structures membranaires des tissus animaux, pour étudier la réponse à l'oxydation des phospholipides des milieux biologiques ou des produits carnés, et le rôle des antioxydants endogènes ou apportés par l'alimentation (178, 179). L'acteur de la peroxydation est le plus souvent le système $\text{FeCl}_3/\text{Ascorbate}$ ou $\text{FeSO}_4/\text{Ascorbate}$. Classiquement les tests d'évaluation de l'état d'oxydation des acides gras mis en œuvre sont le test des substances réactives au TBA (plus connu sous le nom de TBARS) ou la mesure de la consommation d'oxygène.

5.9.2. Cooxydation du β -carotène

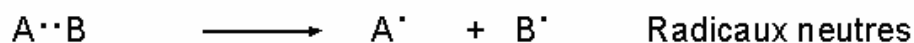
Une autre méthode consiste à cooxyder du β -carotène par l'acide linoléique soumis à une oxydation intensive (170, 173, 174, 180-185). Le β -carotène est un désactivateur de l'oxygène singulet (« quencher »); c'est aussi un piègeur des radicaux libres qui se fixent sur le système diène conjugué de la molécule. On suit, en milieu émulsionné par du Tween, la décoloration du β -carotène par spectrophotométrie, en présence ou en absence d'antioxydant.

5.10. Tests de mesure du pouvoir de piégeage des radicaux libres

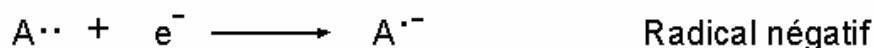
Un radical libre est une entité chimique (atome ou molécule) neutre ou chargée, contenant au moins un électron non apparié, et qui est capable d'avoir une existence indépendante (186).

Les radicaux libres peuvent se former selon différents mécanismes :

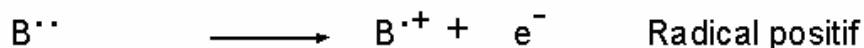
• Scission homolytique d'une liaison covalente



• Réduction monoélectronique



• Oxydation monoélectronique



5.10.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH')

On peut éviter à oxyder le substrat sur lequel on veut tester l'efficacité d'un antioxydant en choisissant de réduire un radical stable. C'est le cas du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH') dont la formule est représentée sur la figure 22.

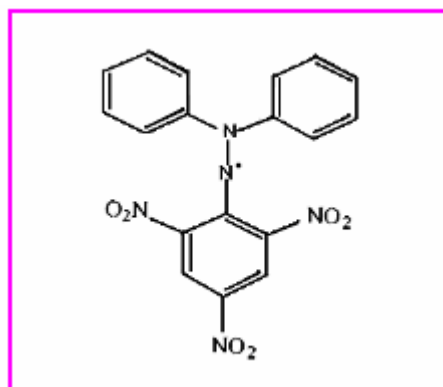


Figure 22 : Formule chimique du radical 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH')

5.10.2. Piégeage des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les radicaux libres tels que le superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), l'hydroxyle (HO^{\cdot}), le peroxyde (ROO^{\cdot}) et l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}) sont connus pour être produits métaboliquement dans les organismes vivants. Par ailleurs, certains dérivés non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide hypochloreux ($HOCl$), peuvent être générés dans les aliments et les systèmes biologiques. Toutes ces espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou ROS (Reactive oxygen species) participent à la chaîne de réactions des radicaux libres et sont connues et reconnues pour leur implication majeure et directe dans différentes maladies telles que l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, l'épaississement des artères, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, l'initiation et le développement du cancer (187, 188). Ainsi, les tests relatifs à la capacité d'une substance à piéger les espèces réactives de l'oxygène devraient être pertinents dans l'évaluation de l'activité antioxydante (163, 186, 189). On rencontre dans la littérature, au moins une variante du test de piégeage pour chaque espèce réactive de l'oxygène ainsi que les autres radicaux stables utilisés tels que le DPPH, l'ABTS (fig. 23) et le DMPD (fig. 24).

5.10.3. Piégeage du radical cation 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS^{•+})

Le test à l'ABTS est basé sur l'inhibition par les antioxydants de l'absorbance de ce radical cation qui possède une absorbance maximale à 415 nm. On trouve dans la littérature plusieurs variantes basées sur différentes stratégies analytiques relatives à ce test : méthodes basées sur la décoloration et l'inhibition dans lesquelles l'absorbance du mélange réactionnel est lue quand la couleur du mélange laissé à l'état d'incubation devient stable ou bien après un temps préalablement fixé, et une autre méthode dans laquelle la durée de la phase qui précède le démarrage de la réaction d'antioxydation est mesurée.

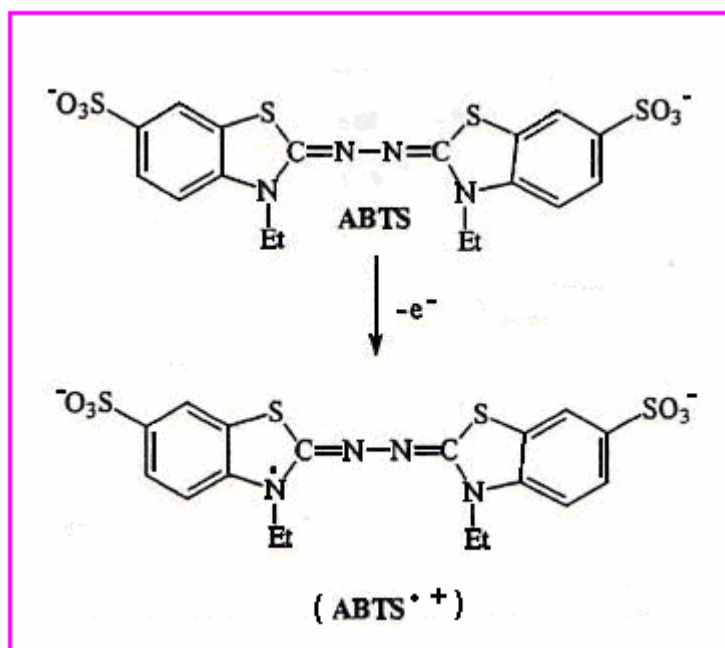
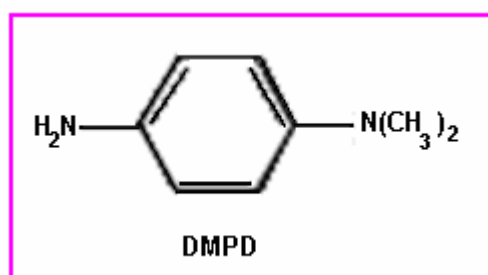


Figure 23 : Structure chimique de l'ABTS et du radical cation correspondant

5.10.4. Piégeage du radical cation obtenu à partir de *N, N*, -dimethyl-*p*-phenylenediamine ou test au DMPD

Dans ce test on utilise le composé hydrophilyque *N, N*, -dimethyl-*p*-phenylenediamine (DMPD) (figure 24) qui en présence d'une solution d'un oxydant approprié (chlorure ferrique) à un pH acide est converti en un radical cation stable et coloré ($\text{DMPD}^{\bullet+}$) qui a un maximum d'absorbance à 505 nm. Les composés ayant un pouvoir antioxydant seront en mesure de céder un atome d'hydrogène à ce radical causant ainsi une décoloration de la solution dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des radicaux. Cette réaction est rapide (moins de 10 minutes) et le point final qui est stable, est pris comme mesure de l'activité antioxydante. Il est important de noter pour cette méthode que la grande stabilité du point final fixé pour les mesures permet l'obtention de valeurs très reproductibles dont les variations en fonction du temps sont négligeables. La présence d'acides organiques, spécialement l'acide citrique dans certains extraits, interfère avec ce test.

Figure 24 : Formule chimique du *N, N*, -dimethyl-*p*-phenylenediamine (DMPD)

6. Conclusion

L'oxydation lipidique est un phénomène complexe, qui met en jeu des espèces très réactives et très labiles, ce qui rend son étude difficile. Le blocage de la chaîne d'oxydation des lipides par les antioxydants n'est pas un mécanisme simple du fait des effets des interactions entre les constituants des milieux complexes

(aliments). Tous les auteurs s'accordent à dire que l'emploi de plusieurs tests ou méthodes pour évaluer l'état de dégradation de la matière grasse est toujours préférable.

Les espèces réactives de l'oxygène sont produites de manière accrue lorsque la régulation du métabolisme de l'oxygène est perturbée (stress oxydant). Ces espèces sont responsables d'une manière directe ou indirecte de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides...), pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires. La recherche sur les oxyradicaux et les antioxydants est parfaitement d'actualité car de nombreux mécanismes bioradicalaires restent encore à préciser aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Chapitre IV :
L'activité antimicrobienne

Chapitre IV : L'activité antimicrobienne

1. Introduction

Empiriquement reconnues depuis des siècles, la confirmation scientifique de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est récente. Elle ne date que du début du siècle dernier avec les travaux du Dr Gattefossé, le père de l'aromathérapie en France. Depuis ce temps, l'utilisation des huiles essentielles s'est développée jusqu'à devenir depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses.

De nombreuses études traitent de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès d'aromathérapie scientifique.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles se trouve à la base des médecines dites alternatives, de nombreux procédés utilisés dans la conservation des produits alimentaires crus ou cuits, de substances actives exploitées dans les produits pharmaceutiques. Cette activité a été utilisée dernièrement pour la conservation du patrimoine bibliographique des musées (190), et elle est naissante pour traiter la qualité de l'air dans les bâtiments (191).

Les effets antimicrobiens de différents végétaux et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ces huiles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et levures. Produits naturels, sains, servant d'arômes alimentaires, les huiles essentielles sont actuellement très étudiées, parallèlement à d'autres extraits de plantes (flavonoïdes, caroténoïdes...) pour mieux cerner leur efficacité comme conservateurs alimentaires.

2. Origines de la contamination

La présence de microorganismes dans les aliments n'ayant pas subi de traitement antimicrobien est tout à fait normale. Sauf exceptions (l'intérieur de l'œuf est naturellement stérile), la matière alimentaire brute contient des microorganismes (271).

Bourgeois et al. (272) décrivent les origines et la nature de cette contamination comme suit :

2.1. Contamination par les microorganismes de l'eau et du sol

La qualité microbiologique de l'eau a une très grande influence sur la contamination des produits alimentaires. En effet, l'eau contient en suspension des microorganismes très divers. Le plus souvent, se sont des bactéries ayant une origine commune avec le sol (*Streptomyces*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*...) ou avec les matières fécales de l'homme et des animaux (Entérobactéries, Entérocoques...). Les moisissures sont également présentes, certaines d'entre elles provoquent des altérations de produits (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Botrytis*...)

2.2. Contamination par les microorganismes de l'air et des poussières

Les produits alimentaires sont exposés à cette contamination lorsqu'ils ne sont pas protégés par un emballage. Le rapport surface/volume est également très important pour la sensibilité à la contamination, les grosses pièces de viande, ou les produits entiers seront moins exposés que lorsqu'ils sont tranchés.

La contamination microbienne atmosphérique est surtout constituée par des bactéries, des moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*...) et plus rarement des levures (*Torulopsis*). Parmi les bactéries prédominent les sporulées et les *Micrococcus* ; les germes pathogènes sont le plus fréquemment absents.

2.3. Contamination par les microorganismes présents naturellement dans un aliment

La peau des animaux, leur pelage ou leur plumage sont sources de contamination. Ces barrières sont efficaces et ne laissent pas passer les germes, mais lors de l'abattage elles deviennent l'une des causes principales de contamination. Les germes les plus fréquents sont *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* et *Candida*. Les légumes sont également porteurs de bactéries (*Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*).

Des microorganismes du tube digestif et des muqueuses des animaux peuvent contaminer les viandes après abattage éviscération et découpe. Se sont essentiellement des Entérobactéries (*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*...) et des *Enterococcus* qui sont minoritaires dans l'intestin, mais ont des capacités d'adaptation qui leur permettent de coloniser les produits organiques et en particulier les aliments.

3. Principaux agents antimicrobiens

Le rôle des agents antimicrobiens est d'inhiber la croissance des microorganismes ou de les détruire (effet microbicide). Nous avons trois types d'agents antimicrobiens :

3.1. Agents physiques

Dans des conditions défavorables, la multiplication des microorganismes est arrêtée et leur survie compromise. Les moyens physiques utilisés pour provoquer artificiellement ces conditions sont :

3.1.1. La chaleur

L'utilisation de la chaleur est un procédé très efficace pour la destruction des microorganismes. Très utilisée au laboratoire pour les milieux de culture et le matériel, les traitements thermiques sont à la base de la conservation de nombreux aliments (271).

3.1.2. Le froid

Le recours obligé au froid s'effectue soit, en restant à température positive c'est la réfrigération, soit en passant dans la zone franchement négative, c'est la congélation. En réfrigération l'eau de constitution reste liquide, alors qu'en congélation une grande partie devient solide (272).

3.1.3. Les radiations

On connaît depuis longtemps les propriétés bactéricides des rayonnements. Par exemple : l'absence de microorganismes à la surface des eaux est due précisément à l'irradiation solaire (UV). Les principaux types de radiations sont électromagnétiques, électroniques et soniques (273).

4. Activité antibactérienne

4.1. Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales bactéricides

Il est nécessaire de définir, pour caractériser l'activité antimicrobienne d'un composé, des paramètres simples. Pour l'activité antibactérienne, le plus courant est la «**Concentration Minimale Inhibitrice**» (**CMI**) qui peut être déterminé par contact direct en milieu gélosé ou en milieu liquide. Elle correspond à la concentration nécessaire pour inhiber totalement la croissance d'un nombre déterminé de germes après un temps d'incubation donné (192).

Fréquemment, la **CMI** n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur. Ceci a amené à définir un autre paramètre : la «**Concentration Minimale Bactéricide**» (**CMB**), parfois appelée aussi «**létale**» (**CML**). Elle correspond à la concentration en inhibiteur nécessaire pour que l'activité bactéricide soit totale sur un inoculum donné après un temps bien déterminé. Elle est estimée en milieu liquide par l'évaluation des survivants après élimination du composé inhibiteur (193).

4.2. Bactéricidie et bactériostase

A la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur les microorganismes : une activité létale (**bactéricidie**) et une inhibition de la croissance (**bactériostase**).

L'activité des huiles essentielles est souvent assimilée à une activité bactériostatique. Cependant plusieurs études ont montré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des **propriétés bactéricides** (194-197) et fongicides (198).

4.3. Souches microbiennes

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé car une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet certaines autres (199). C'est pour cela qu'il est important de mentionner la **dénomination complète ainsi que le Gram des microorganismes** ainsi que **l'espèce botanique et le chémotype de l'huile essentielle** (15).

Les bactéries à Gram positif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram – (200). Cette affirmation n'a cependant pas été confirmée par d'autres travaux. La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram (201), ou dépend des huiles essentielles utilisées (202).

Il semblerait tout de même qu'en règle générale, les bactéries à Gram négatif soient plus résistantes aux huiles essentielles. Ces résultats sont confirmés par de nombreuses expériences (190, 203).

5. Rôle de la méthode dans la détermination de l'activité

Selon la littérature, la diffusion sur gélose et la dispersion en microatmosphères mettent en évidence l'activité biostatique (199), et les mélanges en bouillon nutritif, l'activité biocide (204). Mais des études récentes se sont affranchies de la méthodologie et des essais gélosés peuvent aussi bien démontrer des effets biocides (205).

5.1. Association d'huiles essentielles

Les effets antimicrobiens des associations d'huiles essentielles, comme pour les associations d'antibiotiques, sont définies selon quatre interactions possibles :

- § **Indifférence** : l'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre.
- § **Addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.
- § **Synergie** : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration.
- § **Antagonisme** : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle prise séparément.

5.2. Activité liée à la composition chimique

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant.

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Évalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile essentielle de composition semblable. Il est cependant probable que les composés **minoritaires** agissent de manière **synergique**. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son «*totum* », c'est à dire dans l'**intégralité** de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (206).

Les molécules réputées actives sont des terpénoïdes, car les hydrocarbures saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et de leur faible solubilité (207). L'effet des terpénoïdes sur des membranes bactériennes isolées suggère que leur activité est fonction des propriétés lipophiles des constituants terpéniques, la nature des groupes fonctionnels, leur solubilité en phase aqueuse et la stéréochimie de la molécule (201).

Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont des **phénols** (thymol, carvacrol et eugénol) des **alcools**, (α -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), des **aldéhydes**, des **cétones** et plus rarement des **terpènes hydrocarbonés** (201, 203, 208).

- Les **alcools** sont plus généralement connus pour leur activité létale que bactériostatique sur les cellules végétatives. Ils agissent en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (201).
- Les **aldéhydes** sont de puissants antimicrobiens. Un groupe aldéhydique conjugué à une double liaison est fortement électronégatif. Les composés électronégatifs peuvent induire des réactions de

transfert d'électrons et réagir avec des composés nitrés vitaux pour la bactérie : protéines et acides nucléiques (201, 209).

- Les **phénols** sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Le **thymol** et **l'eugénol** sont responsables de l'activité fongicide (269), et bactéricides des huiles essentielles qui en contiennent (196, 197, 210). La molécule de **thymol** a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches dont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions K^+ . En revanche elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa* (197). Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces (203). Cependant, les phénols ne sont pas seuls responsables de l'intégralité de l'activité ; la totalité de la composition chimique doit être prise en compte (203).

Certaines études ont montré que l'activité (antimicrobienne, antivirale, insecticide, larvicide et ovicide) des huiles essentielles est supérieure à celle des composés majoritaires testés séparément (206). Les **composés purs**, le **thymol** et le **carvacrol** ont un net effet synergique, ce qui expliquerait, en partie, les différentes activités de **chénotypes de thym** (211). Cependant, une étude réalisée en 2001 par **Lambert et al.** (196) ne corrobore pas les effets de synergie mentionnés. Une combinaison de concentrations comparables de thymol et de carvacrol reproduit bien l'inhibition de l'huile essentielle.

6. Méthodes de détermination de l'activité

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité anti-microbienne des huiles essentielles. L'insolubilité des huiles essentielles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une explication de la variété des techniques. Selon la souche microbienne, l'huile essentielle et l'application choisie, divers milieux de culture peuvent être mis en oeuvre.

Les différents protocoles peuvent ainsi être classés :

1. selon le **milieu** dans lequel se fait la **diffusion** de l'huile essentielle, soit liquide, solide ou gazeux,
2. selon la nature du **contact** de l'huile essentielle avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant.

Ces différentes techniques sont répertoriés et décrites dans différentes publications (171, 200, 206, 212-215).

6.2.1. Aromatogramme

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (216). Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri.

Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d'huile essentielle (Figure 25).

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque antibiotique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de

concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (216).

Cette méthode utilisée par la plupart des auteurs (102, 195, 200, 202, 205, 217-220). C'est la technique que nous avons adoptée pour les huiles testées.

Une autre méthode consiste à remplacer le disque par un puits creusé dans la gélose et rempli d'huile essentielle qui en diffusant radialement crée une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (201).

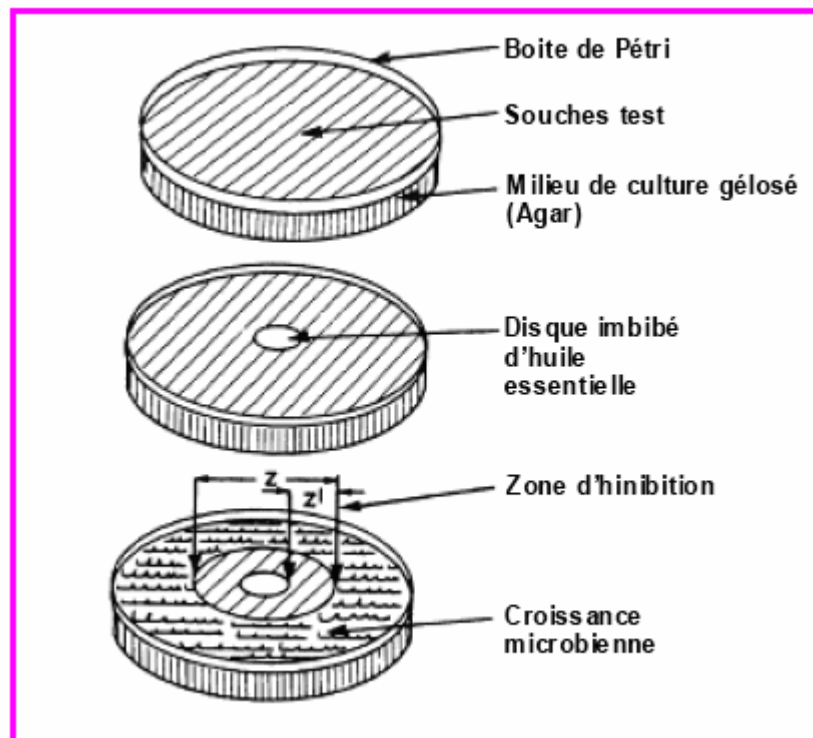


Figure 25 : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri (200).

6.2.2. Microatmosphères

Dérivée de la méthode précédente le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celle des aromagrammes. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné. Dans cette technique, le disque imprégné 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 (Figure 26). Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de l'inoculum.

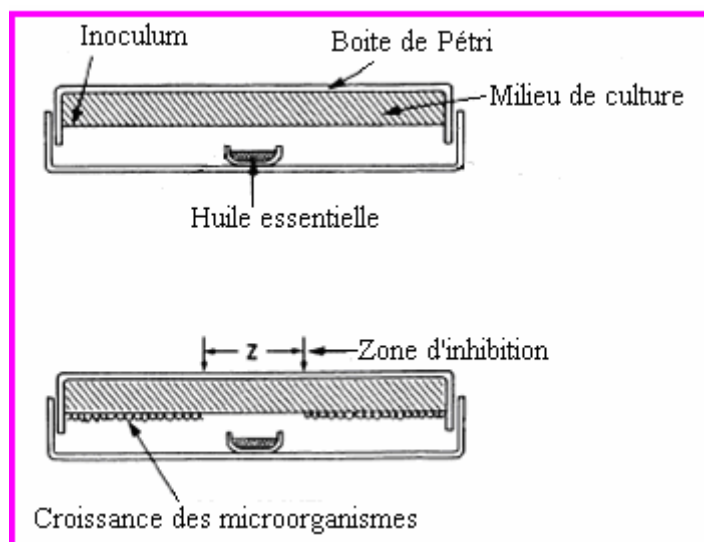


Figure 26 : Illustration de la méthode des microatmosphères (200).

Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des huiles essentielles, elle montre seulement l'activité des constituants volatils à la température d'incubation.

Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse sont encore peu nombreux (190, 191, 204, 211).

7. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sont (192) :

7.1. La température

Certains auteurs ont testé l'effet de la température sur l'activité antibactérienne de l'aldéhyde cinnamique à des concentrations et températures différentes pendant 30 jours sur 4 genres bactériens : *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus* et *Enterobacter*. Ils ont prouvé que la température affecte réellement les propriétés inhibitrices de l'aldéhyde cinnamique (221).

D'autres ont constaté une augmentation des propriétés antibactériennes des carbonyles aromatiques et aliphatiques sur *Staphylococcus aureus* lorsque la température baisse de 37°C à 12°C (222).

7.2. Le pH

Sur 11 composés étudiés dont l'eugénol, le maltol et le menthol, **Jay** et **Rivers** ont constaté une augmentation de l'activité de tous les composés à pH 6 par rapport au pH 8 (223).

A pH 5 et à la température d'incubation de 5°C, 0,01 g.L⁻¹ de diacétyle suffisent pour inhiber *Pseudomonas fluorescens* et *Staphylococcus faecalis*, alors qu'à 15°C, 0,078 g.L⁻¹ et 0,156 g.L⁻¹ sont respectivement nécessaires pour inhiber ces micro-organismes.

8. Conclusion

L'activité antibactérienne d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants.

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à l'intégralité de ses composants et non à ses composés majoritaires. Les mêmes chémotypes d'une même plante peuvent produire des activités différentes.

Les résultats rapportés par différents auteurs sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles ne sont pas toujours concordants et sont parfois même contradictoires.

Chapitre V :
Matériels et méthodes

Chapitre V : Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

1.1. Espèces étudiées

Le matériel végétal (tableau 5) est constitué de plantes d'origan et de thym de différentes espèces et de différentes origines du pays.

Tableau 5 : Espèces de thym et d'origan étudiées

Plante	Espèce	Nombre d'échantillons	Provenance
Origan	<i>O. glandulosum</i>	3	Souhane (Blida) Ouled Slama (Blida) Ighzer Amokrane (Béjaia)
	<i>O. floribundum</i>	3	Chrèa (Blida) à 1500 mètres d'altitude Hammam Mélouane (Blida) Kadiria (Bouira)
Thym	<i>Thymus munbyanus</i>	1	Ighzer Amokrane (Béjaia)
	<i>T. pallescens</i>	18	13 échantillons de Tablat (Médéa) Kadiria (Bouira) Sidi Aissa (Djebel Kef Ennaga) Boussaada (Theniet eddem) Oued Rhiou El Asnam (Bouira)
	<i>T. algeriensis</i>	4	El Asnam (Bouira) 2 échantillons de Chrèa (Blida) à 800m et 1500 mètres d'altitude. Tazmalt (Tizi Ouzou)*
	<i>T. numidicus</i>	2	Yakouren (Tizi Ouzou)
	<i>T. guyonii</i>	1	Djebel Haoues (Djelfa)
	<i>T. dréatensis</i>	1	Takoucht (Bouzeguene -Tizi Ouzou)

* *T. algeriensis* de Tazmalt est le seul à avoir été cueilli et analysé une seule fois (sur une seule année) tandis que *T. munbyanus* a été analysé 3 fois (sur 3 années) et le reste des échantillons deux fois (sur deux ans).

Les huiles essentielles étudiées ont été extraites à partir des parties aériennes constituées par les feuilles, les fleurs ou les feuilles et les fleurs simultanément, selon la saison de récolte et le but recherché.

1.2. Méthodologie d'échantillonnage

1.2.1. Localisation des espèces

Pour la localisation des différentes espèces de thym et d'origan sur le territoire national nous nous sommes servi de ou des origines des spécimens déposés au niveau de l'herbier de l'INA (Institut National Agronomique-

El-Harrach) quand ils existent et/ou de leur localisation signalée par Quezel et Santa (73) ainsi que des connaissances de renommée établie de la flore Algérienne de Feu Abdelkader Beloued que la miséricorde de Dieu soit sur lui.

1.2.2. Authentification des espèces

Le genre *Origanum* en Algérie comporte deux espèces qui peuvent être plus ou moins facilement différenciées. La détermination du genre *Thymus* est toujours délicate, en raison de l'extrême variabilité des espèces et des hybridations interspécifiques. L'authentification des espèces a été réalisée en observant à l'œil nu et au microscope les différentes caractéristiques de chaque espèce telles que décrites par **Quezel et Santa (73)** et par **Morales (118)** qui a réalisé en 1986 une révision du genre *Thymus*. Une décision finale d'attribution de nom à une espèce donnée était prise après avis confirmatif d'un spécialiste. La vérification et la confirmation de l'appartenance de chaque plante à une espèce donnée de chacun des deux genres ont été réalisées par Feu Abdelkader Beloued que la miséricorde de Dieu soit sur lui.

2. Description des espèces étudiées

La description est donnée par Quezel et Santa (73) et Morales (70), nous donnons ci-dessous les principales caractéristiques :

2.1. *T. munbyanus* Boiss. et Reut.

C'est un petit arbuste de 30cm de longueur en moyenne (figure 27). La tige est ciliée, les feuilles (4-11x0.8-1.5mm) sont linéaires et ciliées sur les marges, en général les feuilles florales sont différentes des feuilles caulinaires. Inflorescences en capitule, les bractées (6.5-14x1.5-6mm) sont lancéolées à elliptiques plus au moins velues avec des cils d'environ 1mm. Les fleurs sont très grandes violacées, dépassant un cm de longueur (figure 28). En plus, la fleur porte un calice (5-7mm) avec des dents ciliées et une corolle de 7-12mm de couleur rose. Cette espèce pousse généralement entre 200-1900m d'altitude et fleurit entre avril et juillet.



Figure 27 : *Thymus Munbyanus*

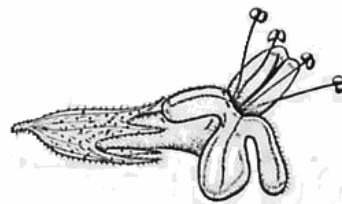


Figure 28 : Schéma du calice et de la fleur de *Thymus munbyanus*

2.2. *Thymus pallescens* de Noé

C'est un petit arbuste de 36cm de longueur en moyenne portant des tiges dressées et robustes (figures 29 et 30). Les feuilles (10-17x3-6mm) sont oblongues lancéolées entières et glabres rarement hispides. L'inflorescence est plus ou moins interrompue à la base (fig 30). Le calice est à 5 dents toutes longuement subulées, bien plus longues que le tube, à lèvre supérieure divisée dans son tiers supérieur (fig. 31). Les fleurs sont blanches à peine plus longues que le calice. C'est une espèce qui pousse généralement entre 450-750m d'altitude.



Figure 29 : *Thymus pallescens* (Tablat)
en période de feuillaison.

Figure 30 : Inflorescences de *T. pallescens*

Figure 31 : Calice d'une
fleur.

2.3. *Thymus dreatensis* Batt.

Petit arbuste d'environ 8cm avec des tiges prostrées longuement rampantes, très boisé vers la base, portant des feuilles ovoïdes toutes identiques (Figure 32). Le calice (3.5-4.5mm) et les feuilles florales sont hérissés de poils raides. C'est une plante très gazonnante à rameaux florifères courts portant des fleurs roses à violettes (figure 33). *Thymus dreatensis* pousse dans les pelouses des hautes montagnes. La période de floraison s'étale du mois de Mai à Juillet. Cette espèce pousse en hautes altitudes souvent dans les fentes des rocailles. En Algérie on la rencontre dans le Djurdjura et le Mont Dréat (Aures).



Figure 32 : Feuille de *Thymus dréatensis*

Figure 33 : *Thymus dréatensis* (Inflorescences)

2.4. *Thymus algeriensis* Boiss. et Reuter

Plante à tiges courbées (fig. 34) et à feuilles florales linéaires glabres peu dilatées et peu différentes des feuilles caulinaires et comportant des glandes sphéroïdales. Les épis florifères sont courts et étroits ne dépassant guère 15×12 mm. Inflorescences en capitule. Les fleurs comportent des corolles moins de deux fois plus longues que les calices. Calice (3.5-4.5mm) dont le tube comporte des cils dispersés et peu abondants. Fleurs roses à blanchâtres. Très commun dans les régions montagneuses, le *Thymus algeriensis* pousse dans les pelouses et les rocailles. C'est une espèce qui est cultivée dans certaines régions, notamment au centre du pays, et vendue dans les marchés à longueur de l'année sous le nom de «Zaitra».



Figure 34 : *T. algeriensis*

2.5. *Thymus numidicus* Poiret

Plante buissonnante, à tiges érigées (Figure 35) et à feuilles lancéolées, plus de 5 fois plus longues que larges (figure 36). Les feuilles florales sont nettement plus larges. Inflorescences en capitule avec des fleurs roses sessiles ou presque (37).



Fig. 35 : *T. numidicus* (période de feuillaison)

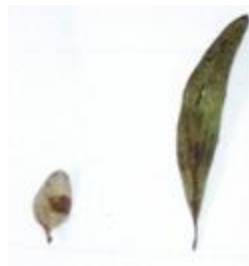


Fig. 36 : Feuilles de *T. numidicus* (à droite) et de *T. guyonii* (à gauche : feuille sèche)



Fig. 37 : Inflorescences (*T. numidicus*)

2.6. *Thymus guyonii* de Noé

Feuilles de 5-7mm, tout au plus 2 fois plus longues que larges (figure 36) non ciliées comportant des glandes rougeâtres. Calice glabre avec des glandes assez denses, généralement non cilié ou avec de très petits cils. Fleurs blanches petites (5-6mm) en inflorescences courtes (1-2cm). Corolle blanche, jusqu'à 7mm, légèrement ciliée, avec des glandes rougeâtres ce qui la différencie de toutes les autres espèces. Tiges plus ou moins prostrées rampantes (figure 38). Pousse dans les rocailles des montagnes du Sahara septentrional. **Quezel** et **Santa** (73) ont signalé en 1963 sa présence même à El-Goléa.



Figure 38 : *Thymus Guyonii* de Noé (Djebel Haoues, Djelfa)

2.7. *Origanum glandulosum* Desf.

C'est une plante herbacée qui porte des tiges toutes dressées (figures 39 et 40). Inflorescences en épis denses, à fleurs blanches (figure 40) restant contiguës après la floraison. Corolle à lèvre inférieure bien plus longue que la lèvre supérieure et un calice non bilabié à 5 dents subégales. Les plantes peuvent atteindre des hauteurs d'un mètre ou plus. Cette espèce peut être à feuilles lisses ou velues.



Figure 39 : *O. glandulosum*
(Période de feuillaison)



Figure 40 : *O. glandulosum* en période de floraison

2.8 *Origanum floribundum* Munby

Plante à tige prostrée à la base (figure 41). Les jeunes tiges sont décombantes. Epis lâches à fleurs disjointes après la floraison. Fleurs roses (figure 42). Corolle à lèvres sensiblement égales. Calice bilabié à 5 dents courtes. La plante peut atteindre ou dépasser un mètre de hauteur.



Figure 41 : *O. floribundum*



Figure 42 : Inflorescences d'*O. floribundum*

3. Localisation des sites producteurs d'huiles essentielles

La localisation et l'observation des sites producteurs d'huiles essentielles des parties aériennes des plantes étudiées sont nécessaires afin de cerner au mieux les mécanismes mis en jeu lors de son extraction. Pour cela, nous avons pratiqué des coupes anatomiques sur les feuilles et les tiges des plantes au sein du département de Botanique de l'Institut National Agronomique en suivant les étapes suivantes :

- 1 – Coupe à main levée en utilisant comme support la moelle de sureau ;
- 2 – Un prétraitement pendant 20 min dans une solution d'hypochlorite de sodium à 12° pour vider les cellules de leur contenu ;
- 3 – Un rinçage dans de l'eau distillée durant 1 à 5 min, puis dans de l'acide acétique à 5 % pendant 5 min ;
- 4 – Une coloration des coupes en utilisant le carmino-vert qui permettra de différencier les parois cellulosiques et les parties lignifiées ;
- 5 – Un montage des coupes dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle est observé immédiatement au microscope photonique doté d'un appareil photo de marque Aus Jena Jenalumar.

Plusieurs coupes ont été observées et les plus intéressantes ont été photographiées.

4. Extraction des huiles essentielles

L'extraction a été réalisée par une seule méthode : L'hydrodistillation. Cette dernière est retenue par la Pharmacopée Européenne. L'extraction des huiles essentielles est réalisée en utilisant un appareil de type Clevenger modifié.

La matière végétale (100g), constituée des parties aériennes (feuilles et fleurs, feuilles seulement ou fleurs seulement) des espèces étudiées, est introduite dans un ballon de 2 L rempli d'eau jusqu'aux 2/3 de sa capacité. Ce dernier est ensuite mis à ébullition pendant 3 heures.

L'huile essentielle recueillie est séchée avec du sulfate de sodium, conservée dans des flacons bruns hermétiquement fermés et couverts de feuilles d'aluminium puis stockés à une température de 5-6°C en vue de son analyse.

4.1. Cinétique de l'extraction

Dans ce travail, nous avons étudié la cinétique d'extraction des huiles essentielles de certaines espèces des deux plantes, avec broyage de la matière végétale et sans broyage. C'est un travail exploratoire dont le but était de déterminer le moyen qui permet d'obtenir les rendements les plus intéressants.

4.2. Rendement de l'extraction

Plusieurs manières d'exprimer le rendement en huile essentielle sont utilisés dans la littérature : rapport (en %masse) entre l'huile extraite et la matière végétale sèche ou humide, rapport du volume d'huile essentielle recueillie pour 100grammes de matière végétale sèche ou humide. Nous avons exprimé les rendements en volume (mL) pour 100g de matière végétale.

5. Fractionnement des huiles essentielles

Nous avons séparé un seul échantillon (une huile essentielle de *Thymus pallescens*) en deux fractions par le biais d'une colonne de type Vigreux dans le but de tester la différence entre l'huile entière et les deux fractions des points de vues composition chimique et activité antioxydante.

6. Caractérisation des huiles essentielles

La caractérisation des huiles essentielles a consisté en :

- L'appréciation des caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur, saveur) ;
- La détermination des indices physiques (densité et indice de réfraction) ;
- L'obtention des profils chromatographiques et une quantification relative des différents constituants.

6.1. Indices physico-chimiques

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) (13).

6.1.1. Densité relative à 20°C : Norme NF T 75 – 111

6.1.2. Indice de réfraction à 20 °C : Norme NF T 75 – 112

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un appareil du type **Bellinghame**.

6.2. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par CPG et CG/SM

6.2.1. Analyse qualitative des huiles essentielles par CPG

- Appareil de type CP Chrompack 9002 ;
- Colonne capillaire : Stabilwax de phase stationnaire polyéthylenglycol (PEG) de Longueur : 30 m ; et de diamètre interne : 0.32mm ; épaisseur du film de la phase : 0,25 µm.
- Températures de l'injecteur et du détecteur (FID), 250 et 280°C respectivement ;

- Programmation de la température : 50°C pendant 3 min puis augmentation de la température à raison de 2 °C/min jusqu'à 220 °C ; maintenu en isotherme pendant 15 min.
- Gaz vecteur : Azote ; débit du gaz vecteur : 1 ml/min ; Volume injecté : 0,2 µL dans le mode d'injection split avec un rapport de division de 1/50.

Mode d'identification

L'identification des composés a été réalisée par comparaison de leurs indices de rétentions en programmation de température à ceux cités par la littérature ainsi qu'à ceux d'étalons injectés dans les mêmes conditions. Pour le calcul de ces indices, un mélange d'alcane (C₆ – C₂₄) est injecté dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon. Les indices de rétention désignés par IK pour éviter toute confusion avec IR (Infrarouge cité dans le premier chapitre) sont calculés selon la formule suivante :

$$IK = 100z + 100n \cdot \frac{t_{Rc} - t_{Rz}}{t_{Rz+n} - t_{Rz}}$$

t_{Rc} : temps de rétention du composé étudié ;

t_{Rz} : temps de rétention de l'alcane à z atomes de carbones qui précède le composé étudié ;

t_{Rz+n} : temps de rétention de l'alcane à $z+n$ atomes de carbones qui suit le composé.

n : différence des nombres d'atomes de carbone.

6.2.2. Analyse semi-quantitative des huiles essentielles par CPG/SM

Chromatographie phase gazeuse (CPG.)

- Appareil du type GC 6890 series GC systems (HP Agilent technologies) ;
- Colonne : HP 5-MS (5% polysiloxane) ; longueur : 30m; diamètre interne : 0,25mm ; épaisseur du film de la phase : 0,25 µm.
- Programmation de la température : 60°C en isotherme pendant 8 min puis augmentation de la température à raison de 2° C/min jusqu'à 280 °C puis laissée en isotherme pendant 30 min.
- Volume injecté : 0,2 µL ; mode d'injection : Splitless à T= 250 °C ;
- Température de détection : 280 °C (interface) ;
- Gaz vecteur : hélium ; Débit du gaz vecteur : 0.5 ml/ min ;

Spectrométrie de masse

- Appareil : HP-5973 (HP Agilent Technologies) ;
- Mode de détection : Scan ; 30-550 amu
- Potentiel d'ionisation : 70 eV ;
- Pression (Source, analyseur) : 6,75 Psi.

L'identification des constituants des huiles essentielles extraites est basée sur :

- La comparaison des spectres de masses des molécules inconnues à ceux des composés purs cités par la littérature.
- En tenant compte de l'ordre d'élution du composé sur la colonne considérée.

- En tenant compte de la proposition et du pourcentage de probabilité de présence du composé fournis par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse (NIST 98, NIST 02 et Wiley 7N).
- Comparaison des indices de rétentions en programmation de température à ceux cités par la littérature sur le même type de colonne.

7. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles

L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par quatre méthodes citées par la littérature. Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles testées a été comparé à un ou plusieurs antioxydants de synthèse (BHT, BHA, acide ascorbique, mannitol) et un antioxydant naturel : le tocophérol.

7.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH[•]

7.1.1. Principe

La capacité de céder des hydrogènes par les huiles essentielles ou par certains composés purs, est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique ou éthanolique contenant le radical libre DPPH[•] (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl). Le temps au bout duquel on mesure le changement de couleur, n'est pas fixé : des temps allant de 2 à 30 minutes et même jusqu'à quelques heures se rencontrent dans la littérature, mais le temps moyen qu'on rencontre très souvent est de 25 minutes. La concentration de la solution de DPPH n'est pas elle aussi définie mais varie souvent d'un auteur à un autre. **Sanchez-Moreno** et *al.* (224) ont proposé en 1998, une nouvelle méthodologie d'évaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH[•]. Leur méthode consiste à déterminer parallèlement à l'activité antioxydante, la cinétique de la réaction du radical avec l'antioxydant.

7.1.2. Mode opératoire

Le test utilisant le DPPH[•] a été réalisé en suivant la méthode décrite par **Burits** et **Bucar** (225) et **Şahin** et *al.*, (226) où 50 µL de chacune des dilutions des huiles essentielles testées sont mélangées dans la cellule placée dans la cuvette du spectrophotomètre avec 2 ml d'une solution méthanolique de DPPH (60µM). Après une période d'incubation de 5 minutes pour 9 échantillons et de 20 minutes pour 9 autres, à la température de laboratoire, l'absorbance est lue à 517 nm. Les expériences sont réalisées en 3 répétitions successives. Le pourcentage d'activité (*I* %) est donné par la formule suivante :

$$I\% = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{éch.}}) / A_{\text{blanc}}] \cdot 100$$

Où : A_{blanc} : Absorbance du témoin ; A_{éch.} : Absorbance de l'échantillon testé ; A_{blanc} représente l'absorbance du DPPH au temps zéro avant addition de l'échantillon d'huile essentielle ou du témoin à une concentration donnée.

7.2. Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

Pour évaluer par le test TBARS l'activité antioxydante des huiles essentielles étudiées et des substances utilisées comme témoins positifs (BHA, BHT, tocophérol), **deux séries d'expériences** ont été menées : une série

avec un initiateur de radicaux, le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) qui servira d'accélérateur de l'oxydation des lipides et l'autre série dépourvue de cet initiateur.

Ce test est réalisé selon la méthode modifiée décrite par **Miguel** et *al.* (103) où le **jaune d'oeuf** est utilisé comme substrat riche en lipides. Le test a été répété 4 fois pour chaque concentration

7.2.1. Mode opératoire

Les différentes étapes de la mise en œuvre du test de TBARS sont résumées dans le schéma ci-dessous :

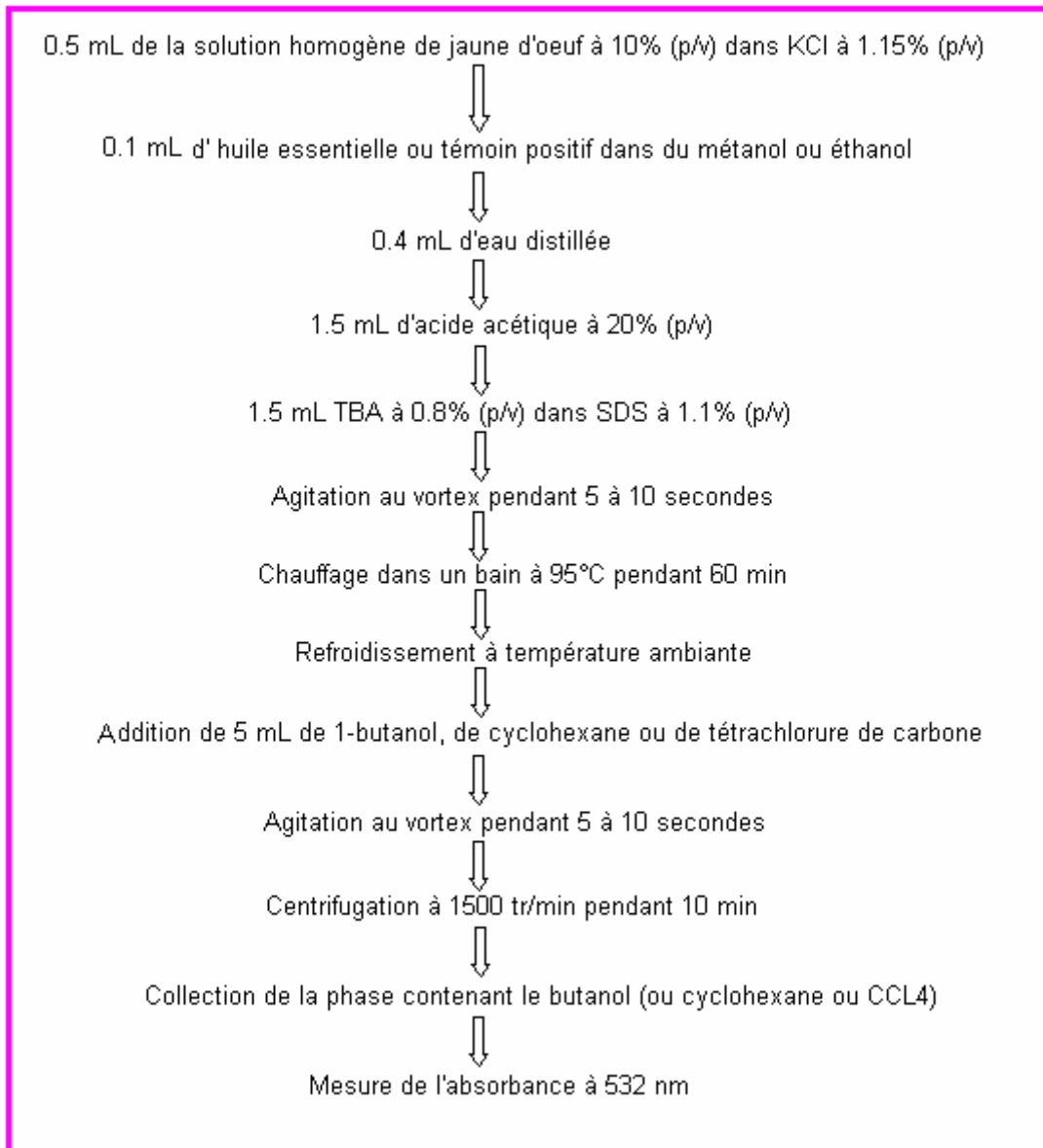


Schéma 1 : Procédé de la mise en œuvre du test de TBARS

Pour la série d'expériences avec l'ABAP, ce dernier est introduit dans le mélange réactionnel (après ajout du TBA) avec une concentration de 0.07 moles /Litre et un volume de 0.05 mL.

La capacité d'inhibition de la peroxydation I en % (ou le pourcentage d'activité antioxydante) est calculée selon la formule suivante :

$$I (\%) = (1 - T/C) \cdot 100$$

Où :

C : Absorbance du témoin complètement oxydé (ou absorbance du témoin négatif) et T : Absorbance de l'échantillon testé.

Le mélange réactionnel relatif au témoin négatif est constitué de tous les réactifs à l'exception de l'échantillon (huile essentielle) tandis que celui du témoin positif contient la substance choisie comme référence de comparaison (BHA, BHT et tocophérol) à la place de l'huile essentielle.

La formule ci-dessus est analogue à celles de tous les tests de l'activité antioxydante utilisés dans ce travail ainsi que celles des autres tests qu'on rencontre dans la littérature. Elles peuvent toutes être déduites par un raisonnement simple. Nous donnons ci-dessous un exemple de détermination pour le test des substances réactives au TBA (TBARS).

100% d'oxydation correspond à une absorption du mélange réactionnel égale à **C**

(100% - I%) correspond à une absorption du mélange réactionnel égale à **T**

D'où :

$$100 \cdot T = C \cdot (100 - I)$$

$$(100 - I) = 100 T / C$$

$$I (\%) = 100 - 100 T / C$$

$$I (\%) = (1 - T/C) 100$$

7.3. Mesure du pouvoir réducteur

L'aptitude des huiles essentielles et de certains composés à réduire le fer ferrique est évaluée par la méthode décrite par Oyaizu (268).

- **Mode opératoire**

L'estimation du pouvoir réducteur des échantillons étudiés (huiles essentielles, BHT, BHA, acide ascorbique et tocophérol) est obtenue selon le protocole expérimental du schéma 2. L'augmentation de l'absorbance indiquera une augmentation du pouvoir réducteur. Le test a été répété 3 fois pour chaque concentration et pour chaque huile ou substance.

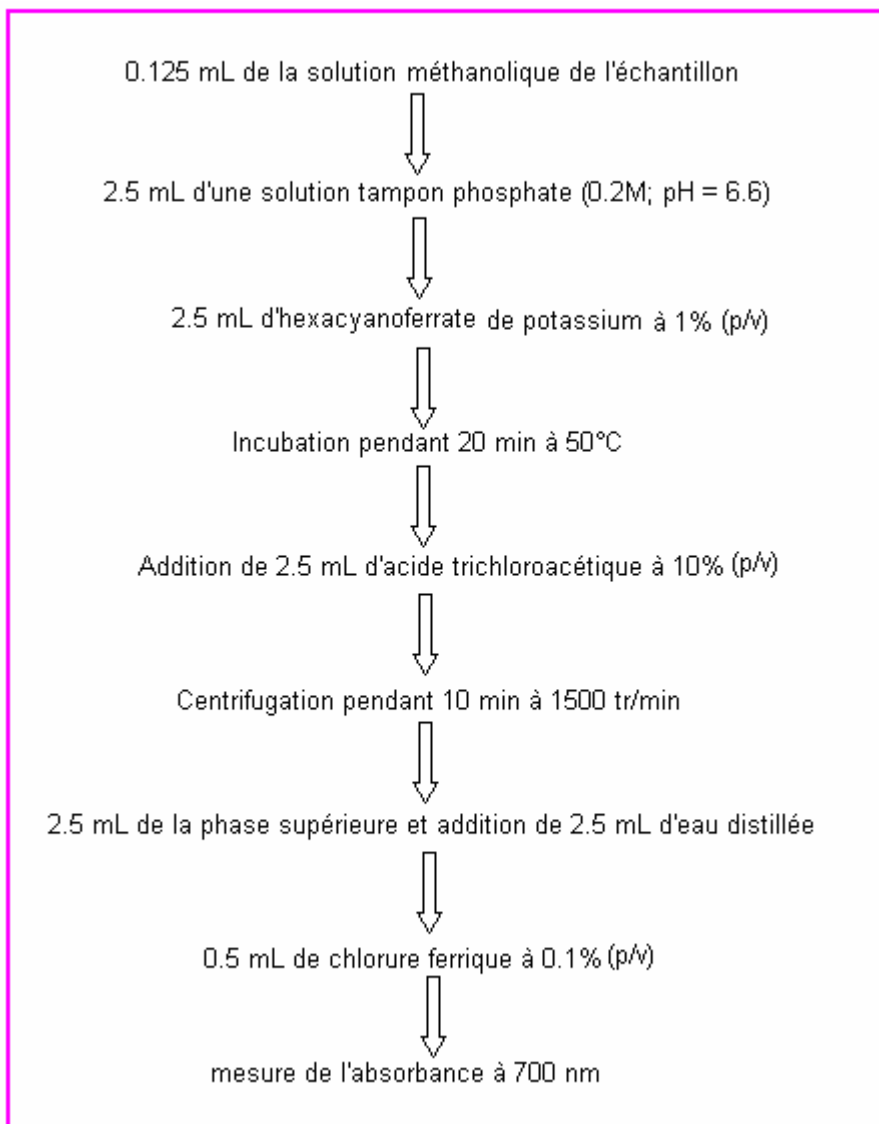
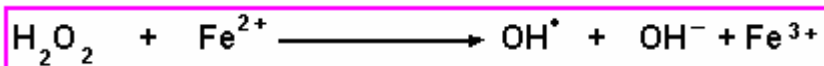


Schéma 2 : Procédure de la mise en œuvre du test du pouvoir réducteur

7.4. Mesure du pouvoir de piégeage du radical hydroxyle (OH[•])

7.4.1. Principe

Ce test est basé sur la réaction de **Fenton** :



Les radicaux hydroxyles qui se forment attaquent le 2-deoxy-D-ribose et le fragmentent (schéma 3). Les composés qui se forment réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former des TBARS dont l'absorbance sera lue à 532 nm.

7.4.2. Mode opératoire

Ce test est réalisé selon la méthode décrite par **Halliwell et al.** (227). Les solutions des différents réactifs (sauf les huiles essentielles) sont fraîchement préparées avec de l'eau distillée dégazée. Avant l'addition du TBA, le mélange réactionnel correspond à un volume total de 1 ml. Le **mannitol** a été utilisé comme témoin

positif. Le test a été répété 3 fois pour chaque concentration. Le protocole expérimental est décrit par le schéma suivant :

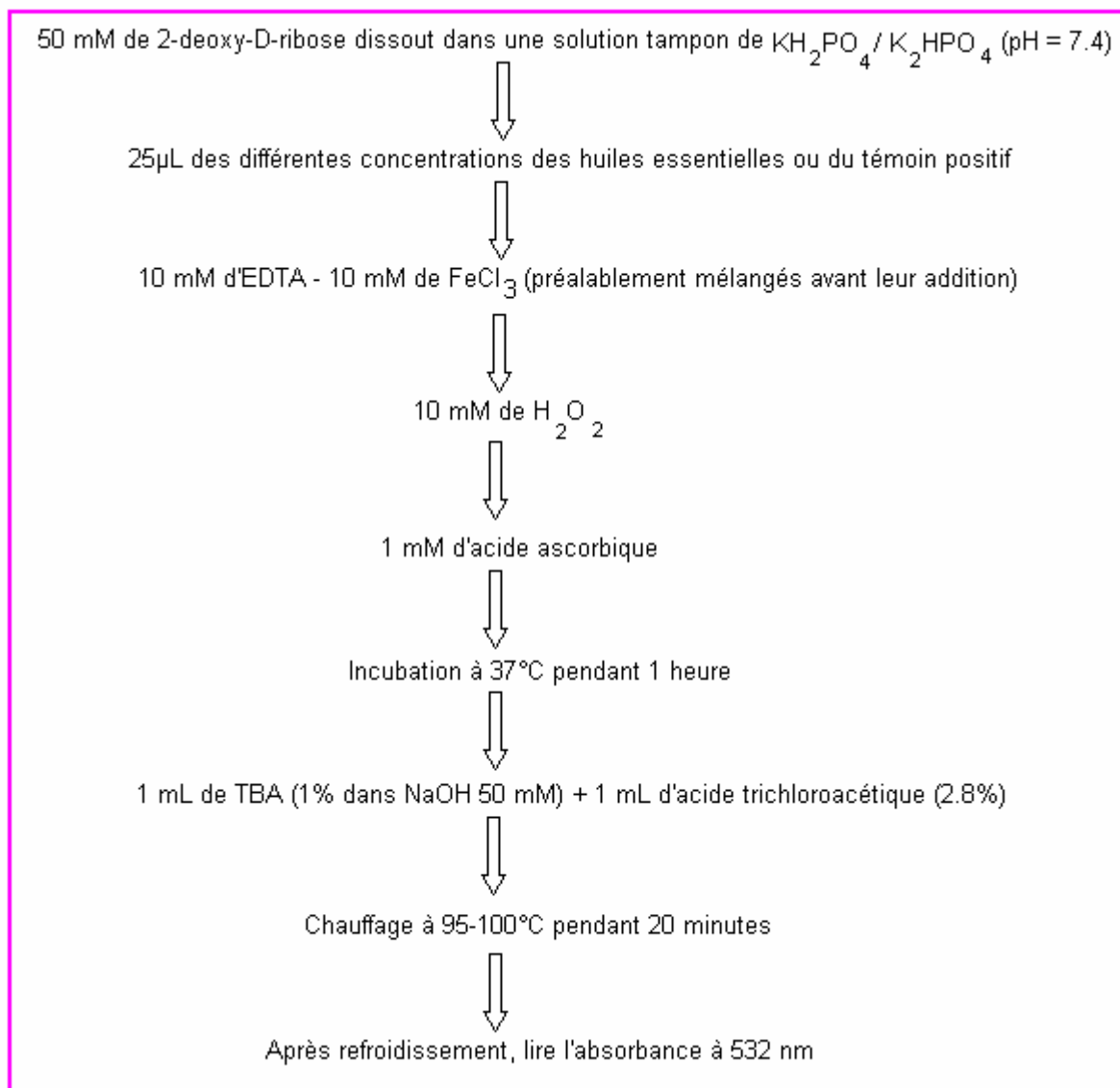


Schéma 3 : Procédé de la mise en œuvre du test du pouvoir de piégeage du radical hydroxyle

L'inhibition **I** en % de la dégradation du déoxyribose (ou le pouvoir de piégeage du radical hydroxyle) est calculée selon la formule suivante :

$$I (\%) = (1 - A_1 / A_0) \cdot 100$$

Où : A_0 = Absorbance du témoin (négatif) et A_1 = Absorbance de l'échantillon.

Le test relatif au témoin négatif est réalisé en utilisant tous les réactifs sauf le composé testé (huile essentielle ou témoin positif correspondant au mannitol dans le cas de notre expérience).

8. Concentration inhibitrice de 50% des radicaux : IC₅₀

Elle est définie comme étant la quantité ou concentration d'antioxydant (huile essentielle ou toute autre substance utilisée comme antioxydant) nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux. En d'autres termes, c'est la concentration nécessaire pour obtenir une activité en % égale à 50. Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant.

9. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles étudiées a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose appelés aromatoigrammes. Dans cette partie nous avons testé 7 souches microbiennes par 4 huiles essentielles et 13 souches de *Listeria monocytogenes* par 9 huiles essentielles.

9.1. Aromatogramme

La méthode des aromatoigrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose de 6 mm de diamètre imprégné de l'huile essentielle à tester ou de l'antibiotique pris comme témoin, à la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri et ensemencée avec le micro-organisme testé. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone claire autour du disque, appelée : zone d'inhibition (Figure 43).

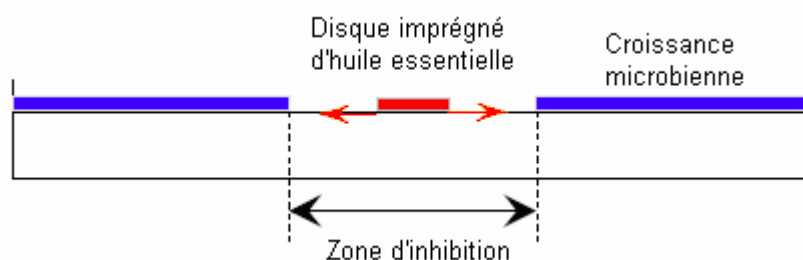


Figure 43 : Schéma simplifié du principe de la méthode des aromatoigrammes

9.2. Micro-organismes testés

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *T. palleescens* de Boussaâda, de *T. dreatensis*, de *T. munbyanus* et d'*Origanum floribundum* de Chréa a été testée sur 7 micro-organismes (tableau 6) issues de la collection du laboratoire et 13 souches de *Listeria monocytogenes* par 9 huiles essentielles (*O. glandulosum* de Souhane, d'Ouled Slama et d'Ighzer Amokrane et *O. floribundum* de Chréa et de Hammam Mélouane, *Thymus palleescens* de Tablat, *T. munbyanus*, *T. numidicus* et *T. guyonii*) (tableau 7). Les souches de *Listeria monocytogenes* ont été fournies par INETI-DTIA du Portugal (Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, Departamento de Tecnologia das Industrias Alimentares)

Tableau 6 : Souches microbiennes testées par les huiles essentielles de *T. palleescens* de Boussaâda, de *T. dreataensis*, de *T. munbyanus* et d'*Origanum floribundum* de Chr  a

Nom de la souche	n�� ATCC*	Gram	Famille	Principales infections causées
<i>Escherichia coli</i>	4157	–	Enterobacteriaceae	Diarrhées dysentériques; Gastro-entérites.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	–	Pseudomonadaceae	Crampes abdominales ; Troubles digestifs.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	–	Enterobacteriaceae	Vasodilatation ; Troubles neurologiques et gastro-intestinaux ; Risque d'abcès pulmonaire.
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	Streptococcaceae	Douleurs abdominales ; Diarrhées aiguës.
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Micrococcaceae	Gastro-entérites ; Infections urinaires ; L'ostéomyélite et l'arthrite.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	+	Micrococcaceae	Infection nasale (sinusites); Infections urinaires ; Infections cutanées.
<i>Candida albicans</i>	24433		Cryptococcaceae	Lésions cutanées ; Infections oesophagiennes ; Infections génitales.

*ATCC : American Type Culture Collection

Tableau 7 : Souches microbiennes testées par les huiles essentielles de *T. palleescens* de Tablat, de *T. munbyanus*, de *T. numidicus*, de *T. guyonii* et d'*Origanum floribundum* de Chr  a et de Hammam Mélouane et d'*O. glandulosum* d'Ighzer Amokrane, de Souhane et d'Ouled Slama

<i>L. monocytogenes</i>	Serotype	<i>L. monocytogenes</i>	Serotype
NCTC 7973	1/2a	C882	4b
Scott A		C895	1/2a
C681	4b	C897	1/2a
C759	Nd*	G14	Nd
C779	Nd	SLU2157	1/2a
C782	Nd	SLU 1922	4b
C830	Nd		

* Non déterminé.

9.3. Protocole expérimental

9.3.1. Préparation de l'inoculum

- **Pour les bactéries**

A partir d'une culture jeune de 18h, on réalise des suspensions en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques, et les mettre dans 5 ml d'eau physiologique stérile (NaCl à 8.5g/L), puis on agite au vortex pendant quelques secondes.

Pour la lecture de la transmittance, on utilise un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. La transmittance doit être entre 22% et 32%, ce qui correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml.

- **Pour les levures**

La préparation de l'inoculum pour les levures est la même que celle pour les bactéries sauf que, pour les levures, la culture doit être jeune de 48h et que la transmittance doit être entre 2% et 3%, ce qui correspond toujours à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml. L'inoculum doit être utilisé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

9.3.2. Examen de l'échantillon

- **Préparation des milieux de culture Selon Giraud (271).**

- **Milieu Mueller-Hinton**

Pour préparer 1L de milieu de culture, il faut :

- Extrait de viande (2 g) ;
- Hydrolysate acide de caséine (17,5 g) ;
- Amidon (1,5 g) ;
- Gélose (10 g).

Les différents ingrédients sont ensuite mélangés puis autoclavés pendant 15 minutes à 115 °C. À la sortie de l'autoclave, le milieu qui doit être de pH 7.4, est réparti dans des flacons de 250 ml.

- **Milieu Sabouraud gélosé**

C'est un milieu Sabouraud-glucose constitué lui-même d'un bouillon gélosé à 2 %. L'addition de la gélose ne s'opère qu'après la préparation du milieu Sabouraud-glucose qui a comme ingrédients : peptone de viande (5 g), peptone de caséine (5 g) et du glucose (20 g).

Le milieu Sabouraud-glucose qui doit être de pH 6,3, est réparti en tubes à essais de 9 à 10 mL, ces derniers sont ensuite autoclavés pendant 20 minutes à 120 °C.

- **Préparation de la première couche du milieu**

La fonte du milieu gélosé Muller-Hinton et le Sabouraud s'effectue dans un bain marie à 95 °C, puis une première couche est versée aseptiquement dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte avec 3 répétitions par souche. Laisser refroidir et solidifier sur la paillasse.

- **Préparation de la deuxième couche du milieu**

Après la fonte du milieu gélosé Muller-Hinton et le Sabouraud dans un bain marie à 95 °C. On refroidit jusqu'à atteindre une température de 45 °C. Des flacons en verre stériles sont remplis avec 50 ml de Muller-Hinton pour les bactéries, et avec 50 ml de Sabouraud pour les levures, ceci pour chacune des souches. 200 µL

de chaque suspension sont ensuite prélevés pour ensemercer les milieux de culture, puis agiter manuellement les flacons et transvaser rapidement 4 mL de chaque milieu inoculé en deuxième couche sur la surface des boîtes contenant déjà la première couche de gélose. Etaler rapidement la seconde couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme, et enfin laisser solidifier sur la paillasse.

- **Dépôt des disques**

Les disques en cellulose stérile, imbibés d'une quantité d'huile essentielle à tester, sont déposés sur la surface de la gélose, puis laissés diffuser sur la paillasse pendant 30 minutes. L'incubation s'effectue à 37 °C pendant 24 H pour les bactéries et 25 °C pendant 48 heures pour les levures.

- Les souches de *Listeria monocytogenes* ont été conservées à -70°C et maintenues à -4°C dans TSA (Trypcase Soja Agar) durant les expérimentations.
- Les milieux de culture de *Listeria monocytogenes* sont le TSA qui est composé de Tryptone (15g/L), de peptone de soja (5g/L), de chlorure de sodium (5g/L) et d'agar (15g/L) et le TSB (Trypcase Soja Broth) composé d'hydrolat trypsique de caséine (17g/L), de peptone de Soja (3g/L), de chlorure de Sodium (5g/L), de phosphate dipotassique (2.5g/L) et de glucose (2.5g/L).

10. Analyse statistique

L'analyse statistique de la variance à deux variables (ANOVA 2) des résultats obtenus pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de nos huiles essentielles a été réalisée avec le logiciel SPSS 8.0. Le niveau de signification est fixé à 5%.

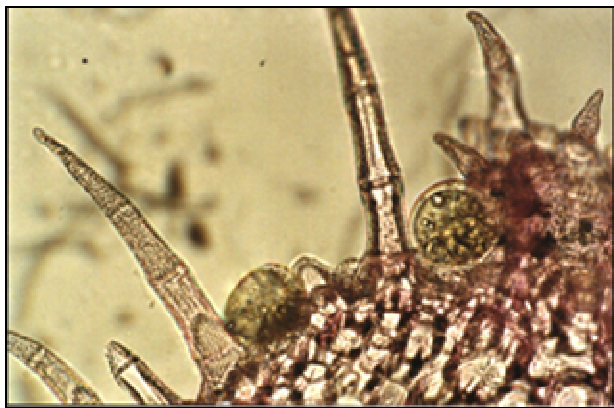
Tous les graphes et les histogrammes obtenus ont été réalisés en utilisant les deux logiciels : Excel (Microsoft Office 2003) et Statistica 6.0.

Chapitre VI :
Résultats et discussions

Chapitre VI : Résultats et discussions

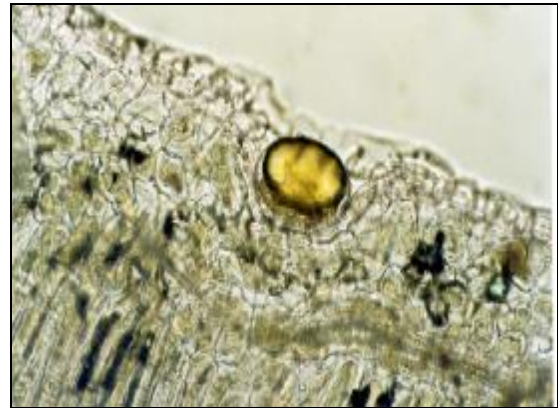
1. Localisation des sites producteurs des huiles essentielles

L'observation des coupes histologiques réalisées sur les feuilles et les tiges des espèces de thym (*T. pallescens*, *T. munbyanus*, *T. dréatensis* et *T. numidicus*) et d'origan (*O. glandulosum* et *O. floribundum*) révèle la présence de poils técteurs, sécréteurs et glandulaires illustrés par les figures 44-53 et schématisés par les figures 49 et 51. Seuls les poils glandulaires et sécréteurs ont l'aptitude de biosynthétiser, sécréter et séquestrer les huiles essentielles en quantité significative (228, 229). Ces types de poils étaient beaucoup plus répandus et plus denses sur les feuilles que sur les tiges et on peut même les voir à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe et nous en avons fait une simple photo agrandie (figure 53). C'est la raison principale qui fait que les tiges produisent une quantité infime d'huiles essentielles par rapport aux feuilles et aux fleurs. Par ailleurs, ces dépôts exogènes d'huiles suggèrent à première vue la non nécessité d'un broyage de la matière végétale.



(Agrandissement : 25 x 3,2)

Figure 44 : Coupe transversale de la tige de *T. dréatensis*



(Agr. : 25 x 3,2)

Figure 45 : Coupe transversale de la feuille de *T. munbyanus*

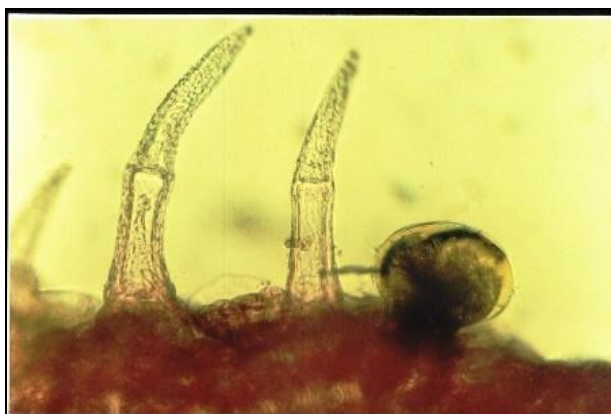


Figure 46 : Tige de *T. pallescens* (Agr. : 25 x 3,2)

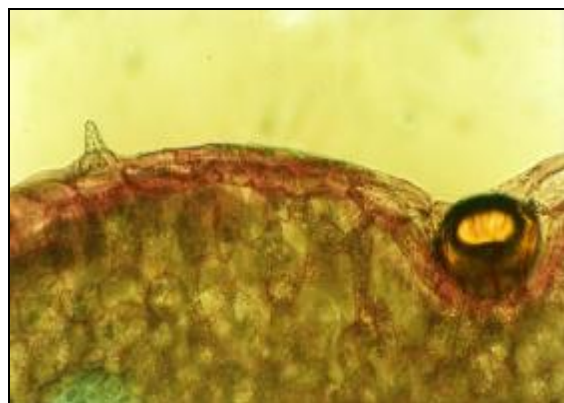


Figure 47 : Feuille *T. pallescens* (Agr. : 25 x 3,2)



Figure 48 : Tige d'*Origanum floribundum* (3.2x12.5)

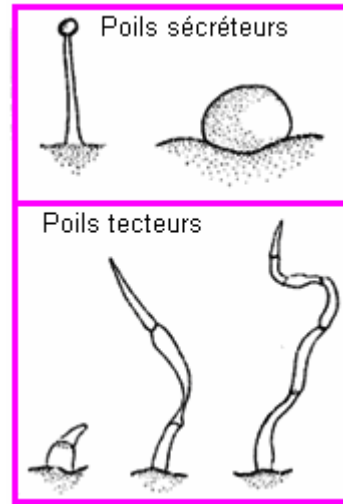


Figure 49 : Schéma des poils sécréteurs (haut) et tecteurs (bas).

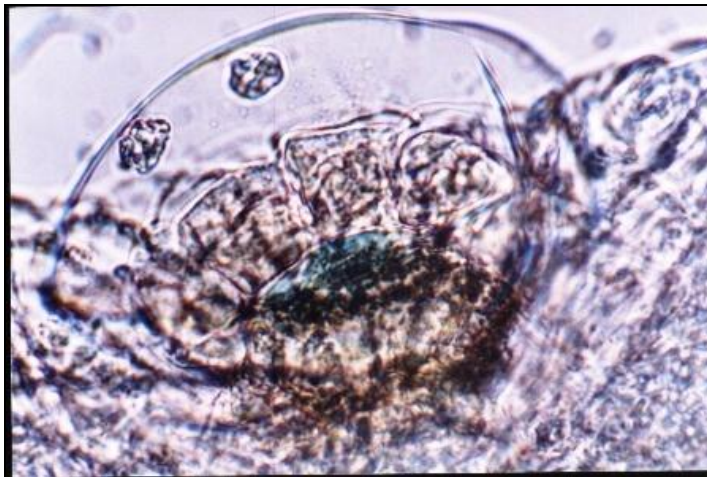


Figure 50 : Coupe transversale d'une feuille d'origan observée au microscope photonique mettant en évidence la présence de poils glandulaires (Gr : 100 x 3,2).

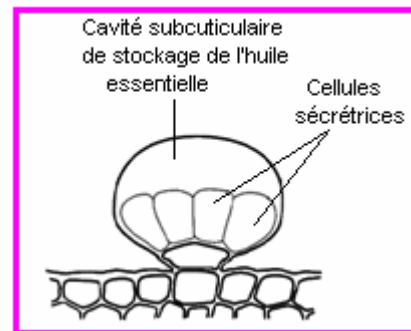


Figure 51 : Schéma d'un poil glandulaire.



Figure 52 : Coupe d'une feuille d'*Origanum glandulosum* avec des poils sécréteurs et un poil tecteur.

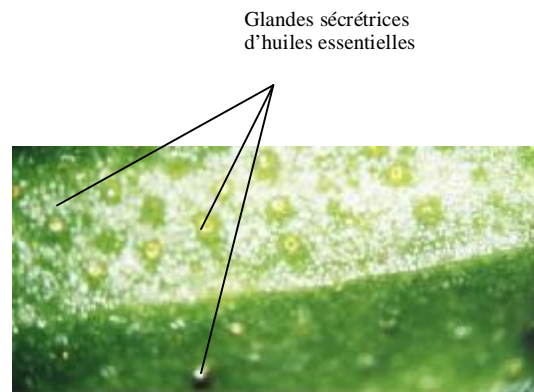


Figure 53 : Photo agrandie d'une partie d'une feuille de *Thymus numidicus* sur laquelle on peut voir des glandes sphériques ou sous forme de points.

2. Rendements des extractions

Les rendements exprimés en mL pour 100g de matière végétale des différentes espèces de thym et d'origan étudiées (Tableau 8), diffèrent parfois énormément pour des échantillons d'une même espèce et de différentes provenances.

Pour les *Origanum* le rendement le plus élevé a été enregistré pour *O. floribundum* de Chréa (4.5%) et le plus faible pour *O. glandulosum* de Béjaia. Le résultat trouvé pour *O. floribundum* de Chréa est différent de ceux cités par d'autres auteurs (0.7%) (140) et 3.1% en mL/100g de matière sèche (108) pour la même espèce et la même provenance. Les valeurs des rendements trouvés pour *O. glandulosum* se situent entre celles rapportées par d'autres auteurs (0.8-4.5%) pour d'autres régions (tableau 9), mais si l'on considère le fait que les valeurs indiquées par ces auteurs se rapportent à la matière sèche on peut estimer que les origans issus de la région de Blida sont riches en huiles essentielles. En effet, des extractions réalisées sur la matière sèche de l'origan d'Ouled Slama ont fourni un rendement moyen de 4.9%. Au vu de nos résultats et de ceux rapportés par différents auteurs (tableau 9) on peut dire que les *Origanum* d'Algérie se classent parmi ceux considérés comme riches en huiles essentielles (rendement >2%).

Tableau 8 : Rendements (mL/100g) des extractions à partir de la matière fraîche en période de floraison des différentes espèces de thym et d'origan

Plante	Espèce	Provenance	Rendement (mL/100g)
Origan	<i>O. glandulosum</i>	Souhane (Blida)	3.2
		Ouled Slama (Blida)	2.5
		Ighzer Amokrane (Béjaia)	1.8
	<i>O. floribundum</i>	Chréa (Blida) à 1500 mètres d'altitude	4.5
		Hammam Mélouane (Blida)	2.9
		Kadiria (Bouira)	2.8
Thym	<i>Thymus munbyanus</i>	Ighzer Amokrane (Béjaia)	1.8
		Tablat (Médéa)	3.7
	<i>T. pallescens</i>	Kadiria (Bouira)	3.3
		Sidi Aissa (Djebel Kef Ennaga)	3.2
		Boussaada	2.8
		Oued Rhiou	6.2
		El Asnam (Bouira)	2.7
	<i>T. algeriensis</i>	Chréa (800m d'altitude)	0.4
		Chréa (1500 m d'altitude)	0.7
		El Asnam (Bouira)	0.5
		Tazmalt (Tizi Ouzou)	0.4
<i>T. numidicus</i>	Yakouren (Tizi Ouzou)	2.6	
	Yakouren (Tizi Ouzou)	2.4	
<i>T. guyonii</i>	Djebel Haoues (Djelfa)	1.0	
<i>T. dréaternsis</i>	Takoucht (Tizi Ouzou)	2.3	

Pour les *Thymus*, un rendement remarquablement plus élevé que les autres a été obtenu avec *T. pallescens* de Oued Rhiou (6.2%). Parmi les espèces étudiées, *T. pallescens* est le plus abondant, le plus répandu après *T. algériensis* et semble être le plus riche en huiles essentielles. Les rendements les plus faibles ont été enregistrés pour *T. algériensis* (0.4-0.7%) et sont faibles par rapport au résultat enregistré pour la même espèce issue de Médéa (1.13% g/100g) (95). Pour les autres espèces, les seules données que nous avons trouvées concernent *T. numidicus* du Constantinois où des rendements de 1.45 (mL/100g) et 2.1% (g/100g) sont rapportés (97, 106).

Tableau 9 : Rendements en huiles essentielles (%) d'*O. glandulosum* cités dans la littérature

Provenance et année	Rendement (mL/100g matière sèche)*	(%en de Référence)
Sétif (2002)	2.1-4.5	(135)
Blida (Plante commerciale), (2002)	1.1	(108)
Sétif, Bejaia, Biskra, Bordj-Bouarreridj, M'sila et plantes commerciales (2006)	0.8 -3.0	(230)
Sétif (2005)	2.7	(231)
Tlemcen (2008)	4.8	(138)

* Les rendements rapportés ne donnent aucune indication sur les taux d'humidité des plantes.

Les rendements obtenus pour *T. pallescens* de Tablat à 3 stades du cycle végétatif et en quatre années successives (2003-2006) et au même lieu montrent de légères fluctuations d'une année à une autre (tableau 10).

Tableau 10 : Rendements en huiles essentielles (mL/100g de matière sèche) de *T. pallescens* à différentes périodes du cycle végétatif en 4 années successives

Année/Période	2003	2004	2005	2006
Début du cycle végétatif (fin du mois de janvier)	1.0	0.9	1.3	1.2
Période de feuillaison (fin du mois de mars)	2.6	2.4	3.1	2.7
Période de floraison (3 ^{ème} semaine de juin)	4.6	4.2	4.3	4.4

Les rendements à partir des feuilles et des fleurs de *T. pallescens* et d'*O. floribundum* de Kadiria (tableau 11) montrent que les inflorescences fournissent la plus grande partie des huiles essentielles en période de floraison. Une différence importante est enregistrée entre les rendements fournis par les fleurs et les feuilles d'*O. floribundum* (2.0 vs 5.4%), par contre la différence est moins importante entre les feuilles et les fleurs de *T. pallescens* (2.8 vs 3.7%).

Tableau 11 : Rendements en huiles essentielles des feuilles et des fleurs (mL/100g de matière fraîche) de *T. pallescens* et d' *O. floribundum* de Kadiria

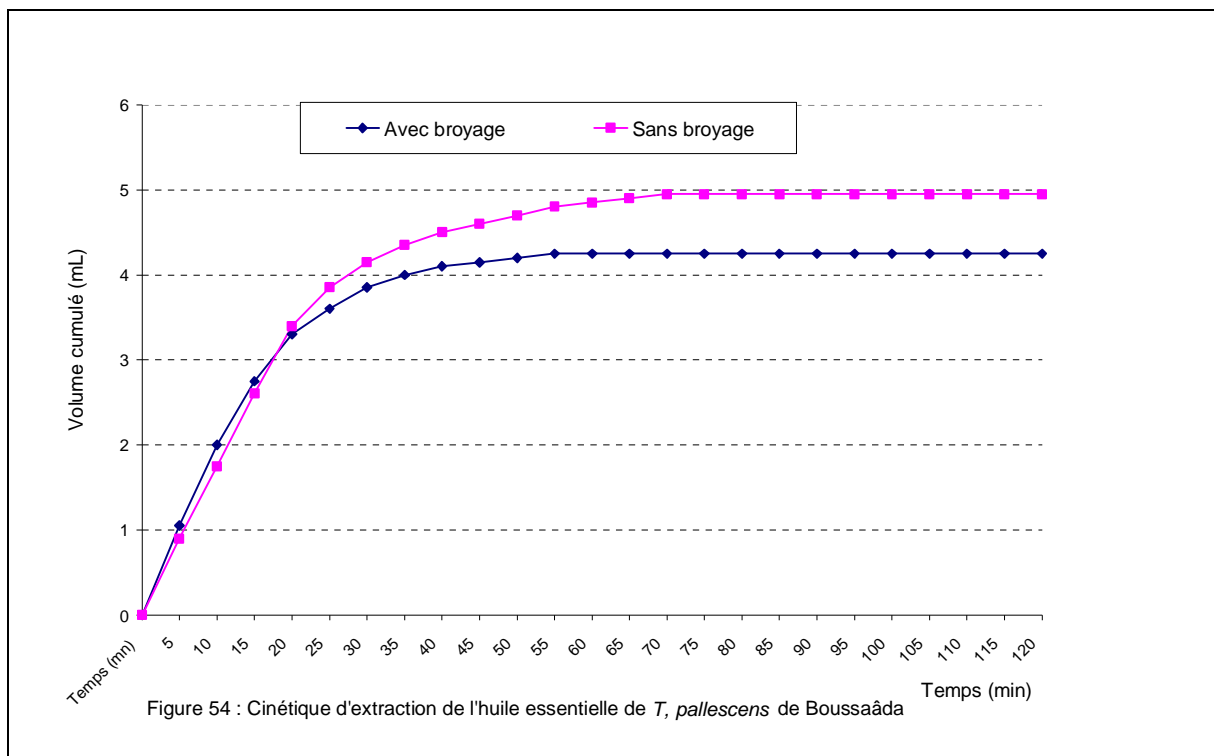
Plante	Feuilles	Fleurs
<i>Thymus pallescens</i>	2.8	3.7
<i>Origanum floribundum</i>	2.0	5.4

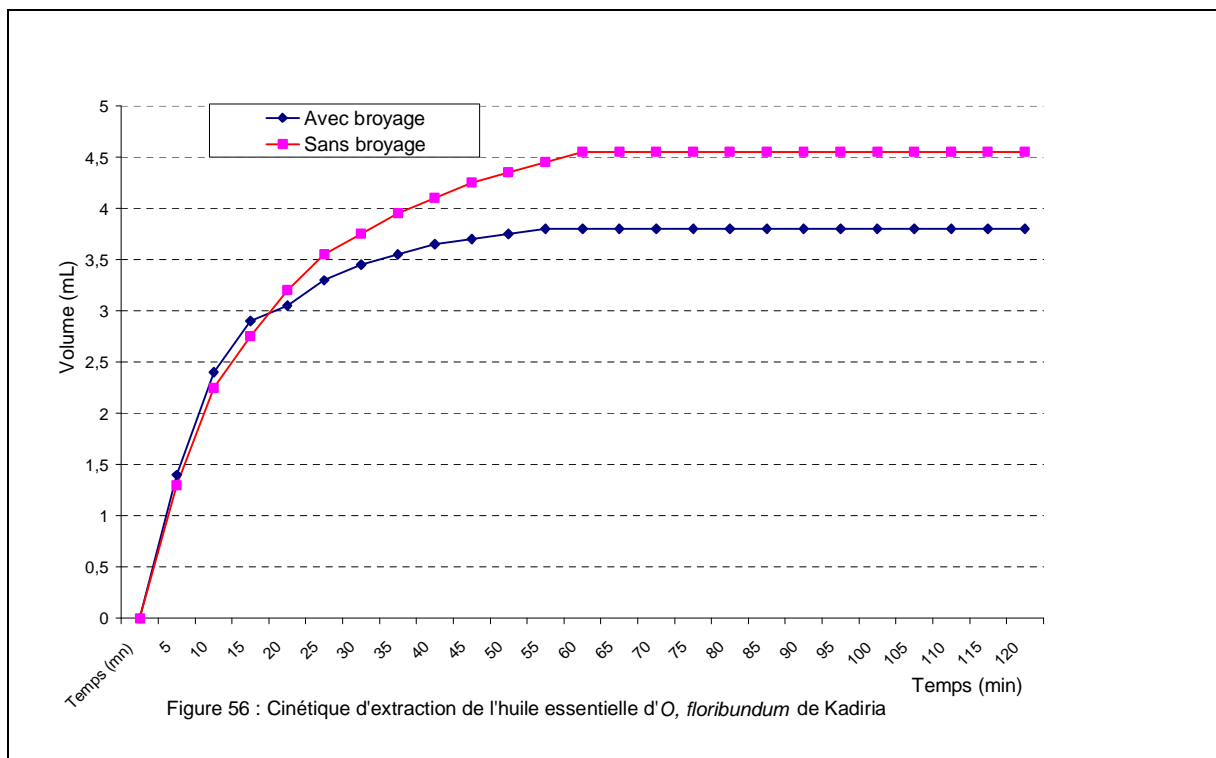
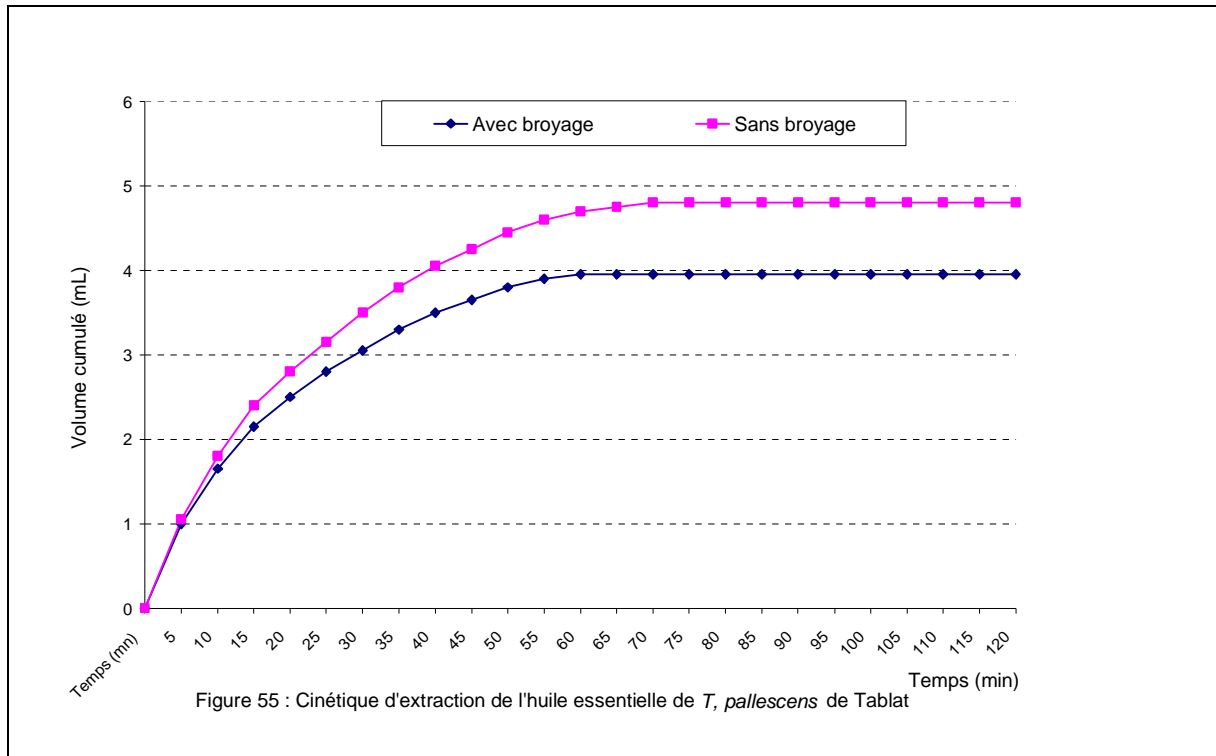
3. Cinétique d'extraction des huiles essentielles

Dans le but d'étudier l'influence de l'état de la matière végétale (entière ou broyée) sur la cinétique d'extraction, nous avons suivi l'évolution du rendement en huile essentielle en fonction de la durée d'extraction. Une masse sèche d'environ 100g a été soumise à une hydrodistillation pendant une durée de 120 minutes. Les volumes ont été enregistrés à des intervalles de temps réguliers. Cette étude a été réalisée sur les espèces de thym : *T. pallescens* de Boussaâda, de Kadiria et de Tablat, *T. dréatensis* et *T. numidicus* ; et sur les origans : *O. floribundum* de Kadiria, *O. floribundum* de Chréa, *O. glandulosum* de Béjaia.

L'allure générale de toutes les courbes relatives à toutes les espèces étudiées citées précédemment est la même. Nous avons reporté seulement 3 d'entre ces courbes (fig. 54-56) qui se caractérisent toutes par des paliers dont les uns correspondent à la matière broyée et les autres à la matière non broyée. Toutes les courbes se caractérisent aussi par une partie ascendante où la majeure partie de l'huile est extraite et un palier au cours duquel la quantité recueillie est pratiquement nulle. Généralement, selon nos conditions opératoires le palier d'une courbe relative à une extraction avec broyage est atteint entre 55 et 65 minutes tandis que celui d'une courbe correspondant à la matière entière est atteint entre 60 et 75 minutes.

Dans tous les cas nous avons constaté que le rendement obtenu avec la matière non broyée était supérieur à celui obtenu avec la matière broyée. Nous avons fait remarquer précédemment que les huiles essentielles étaient localisées dans des sites exogènes sur toute la surface des feuilles et des calices et par conséquent un broyage pouvait ne pas être nécessaire. Par ailleurs, le broyage pourrait entraîner des pertes de l'huile essentielle et par conséquent des diminutions de rendements.





4. Caractéristiques des huiles essentielles

4.1. Caractéristiques physiques et organoleptiques

La densité relative, la couleur et l'indice de réfraction de quelques espèces de thym et d'origan (Tableau 12) indiquent une grande variabilité de ces caractéristiques physiques. Les odeurs des huiles essentielles de la

quasi-totalité des espèces de thym ainsi que celles des origans se ressemblaient. Ces odeurs étaient caractéristiques, aromatiques, phénoliques, agréables avec un fond légèrement épicé (AFNOR 2000). Seules les huiles essentielles de *Thymus algeriensis* de Tazmalt, d'El Asnam et de Chréa (cueilli à 1500m d'altitude) ainsi que celle d'un échantillon de *T. numidicus* avaient des odeurs différentes et un peu particulières. Le recueil de normes AFNOR indique les caractéristiques des huiles essentielles de *Thymus zygis* et *Thymus mastichina* d'Espagne (Tableau 13). Pour l'origan aucune norme n'est encore établie.

Tableau 12 : Densité relative à 20°C, couleur et indice de réfraction à 20°C de quelques espèces de thym et d'origan

Plante	Espèce	Provenance	Couleur	densité	Indice de réfraction	
Origan	<i>O. glandulosum</i>	Souhane	Orange	0.894	1.495	
		Béjaia	Jaune claire	0.912	1.420	
		Chréa	Jaune pâle	0,936	1.500	
	<i>O. floribundum</i>	Hammam	Jaune pâle	0.756	1.488	
		Mélouane				
		Kadiria	orange	0,920	1.493	
Thym	<i>T. munbyanus</i>	Béjaia	Jaune claire	0.896	1.512	
	<i>T. pallescens</i>	Tablat	orange	0.910	1.503	
		Boussaada	Rouge orange	0.947	1.505	
	<i>T. numidicus</i>	Yakourene	Jaune pâle	0.853	1.496	
	<i>T. dréatensis</i>	Takoucht	Jaune pâle	0.937	1.485	

Tableau 13 : Caractéristiques physiques et organoleptiques de *Thymus zygis* et *Thymus mastichina* selon AFNOR (2000)

Huile essentielle	Aspect, couleur	Odeur	Densité relative à 20°C	Indice de réfraction à 20°C
<i>Thymus zygis</i> Leofl.	Liquide, brun rouge	Caractéristique, Aromatique, phénolique, agréable avec un fond légèrement épicé.	0.915	1.496
			à 0.935	à 1.505
<i>Thymus mastichina</i> L.	Liquide Jaune pale		0.900	1.462
			à 0.920	à 1.468

4.2. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par CPG et CG/SM

4.2.1. Huiles essentielles de l'origan

4.2.1.1. *Origanum floribundum*

La composition chimique des trois échantillons d'*O. floribundum* (tableau 14), montre que les principaux composés de cette espèce sont le p-cymène avec 15,5 et 24,9%, le γ -terpinène avec 19,9 et 22,3% et le thymol avec 33,6 et 27,3% pour les échantillons de Kadiria et Hammam Mélouane, respectivement, tandis que celui provenant de Chréa avait du carvacrol (29,6%) comme composé principal à coté du p-cymène (18,5%) et du γ -terpinène (13,7%). Les seules études de la composition chimique d'*O. floribundum* que nous avons trouvé dans la littérature (tableau 15) rapportent toutes, le carvacrol comme composé majoritaire suivi par le p-cymène le γ -terpinène et le thymol. Mais, il y a lieu de remarquer que les échantillons rapportés dans la littérature proviennent tous les deux de Chréa et leur composition a un profil en composés majoritaires similaire à celui de notre échantillon cueilli au parc National de Chréa. Par contre, les huiles essentielles des plantes provenant de Hammam Mélouane et Kadiria (figure 57) ont le thymol comme composé principal. Ce résultat indique la mise à jour d'un nouveau chémotype caractérisé par une forte teneur en thymol à l'opposé de ce qui a été rapporté auparavant (95c). Cependant, dans tous les cas le thymol, le carvacrol et leurs précurseurs biogénétiques (γ -terpinène et p-cymène) forment la majeure partie des huiles essentielles avec une teneur de plus de 70% (tableau 15).

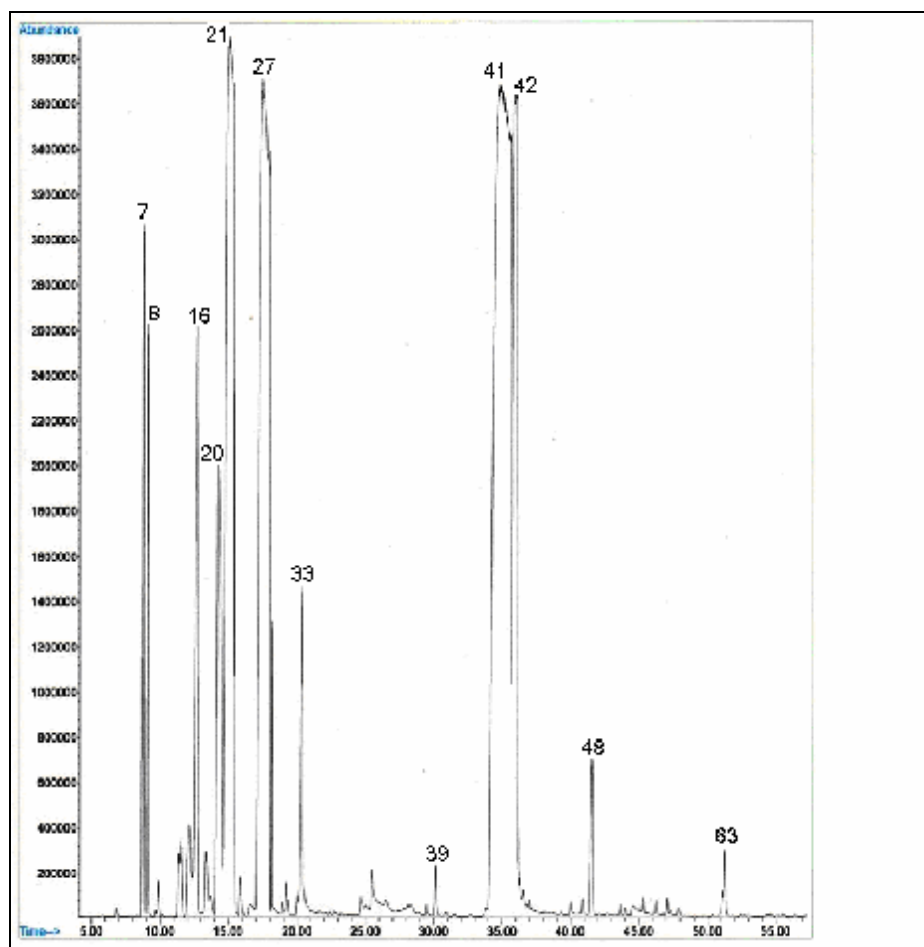


Figure 57 : Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle d'*O. floribundum* de Kadiria

Tableau 14 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons d'*Origanum floribundum*

N°	¹ Composés	² Indices de rétention		<i>Origanum floribundum</i>			³ Identification
		HP5MS	PEG	Chróa	Hammam melouane	Kadiria	
1	Methyl isovalerate	765		0.1	t	-	a, c
2	Ethyl n-valerate	847		-	-	t	a, c
3	(E)-2-Hexenal	850		t	t	t	a, c
4	3-Hexen-1-ol	862		t	-	t	a, c
5	3-Heptanone	887		t	t	t	a, c
6	Tricyclene	923		t	t	t	a, c
7	α -Thujene	925	1029	3.7	3.1	2.8	a, c
8	α -Pinene	939	1026	2.2	1.8	1.8	a, b, c
9	2,4(10)-Thujadien	945		-	-	t	a, c
10	Camphene	951	1072	0.1	t	0.1	a, b, c
11	Verbenene	953	1121	t	t	t	a, b, c
12	Sabinene	973	1132	0.2	0.7	0.2	a, c
13	β -Pinene	978	1119	0.6		0.4	a, b, c
14	1-Octen-3-ol	986	1462	-	-	0.9	a, c
15	3-Octanone	987	1225	-	-	t	a, c
16	β -Myrcene	992	1173	2.9	4.8	3.6	a, b, c
17	3-Octanol	1101	1393	-	-	t	a, c
18	α -Phellandrene	1007	1177	-	-	0.5	a, b, c
19	δ -3-Carene	1009	1163	-	-	t	a, b, c
20	α -Terpinene	1017	1192	2.5	2.1	4.8	a, b, c
21	p-Cymene	1026	1290	18.5	24.9	15.5	a, b, c
22	Limonene	1044	1212	t	-	0.1	a, b, c
23	β -Phellandrene	1045	1222	-	t	0.7	a, b, c
24	1,8-Cineole	1046	1223	t	t	0.1	a, b, c
25	<i>trans</i> - β - Ocimene	1047	1246	-	-	0.2	a, c
26	<i>cis</i> - β - Ocimene	1052	1272	-	-	0.1	a, c
27	γ - Terpinene	1060	1261	13.7	22.3	19.9	a, b, c
28	<i>cis</i> -Sabinene Hydrate	1075	1567	t	t	0.6	a, c
29	1-Nonen-3-ol	1088	1525	t	t	0.1	a, c
30	α -Terpinolene	1093	1300	0.3	0.3	0.1	a, b, c
31	p-cymenyl	1095	1452	-	-	0.1	a, c
32	<i>trans</i> -Sabinene Hydrate	1101	1482	0.1	t	0.1	a, c
33	Linalool	1104	1558	3.8	2.4	1.7	a, b, c
34	Borneol	1166	1732	-	t	0.1	a, b, c
35	Terpinen-4-ol	1177	1613	0.3	0.1	0.2	a, b, c
36	α -Terpineol	1190	1723	-	0.4	0.1	a, b, c

37	<i>trans</i> -Dihydrocarvone	1200	1647	t	0.1	-	a, c
38	Thymol methyl ether	1235	1611	0.4	0.6	t	a, c
39	Carvacrol methyl ether	1245	1976	6.9	3.6	0.2	a, c
40	Thymoquinone	1260	2176	-	t	t	a, c
41	Thymol	1297	2212	8.4	27.3	33.6	a, b, c
42	Carvacrol	1317	2238	29.6	1.6	8.5	a, b, c
43	Thymyl acetate	1352	1949	t	-	t	a, c
44	Eugenol	1373	2192	0.1	-	-	a
45	Carvacryl acetate	1391		0.1	t	-	a
46	Geranyl acetate	1392	1778	t	-	-	a
47	α -Gurjunene	1403	1549	-	-	t	a, c
48	β -Caryophyllene	1417	1620	0.7	1.4	0.8	a, b, c
49	α -Bergamotene	1438		-	t	-	a, c
50	α -Humulene	1452	1687	t	0.4	t	a, c
51	1,6,6-Trimethylbicyclo[3.3.0]octan-3-one *	1454		1.1	0.3	-	a
52	Allo-aromadendrene	1457	1663	-	-	t	a, c
53	Germacrene D	1480	1742	t	0.1	0.1	a, c
54	β -Ionone	1486		t	-	-	a, c
55	Bicyclogermacrene	1495	1766	-	0.1	t	a, c
56	β -Bisabolene	1506	1748	0.1	0.2	0.1	a, c
57	γ -Cadinene	1511	1776	t	0.1	t	a, c
58	δ -Cadinene	1519	1772	t	0.2	t	a, c
59	β -Sesquiphellandrene	1525		t	-	-	a, c
60	<i>cis</i> - α -Bisabolene	1540		t	t	-	a, c
61	Germacrene D-4-ol	1569		-	0.1	t	a, c
62	Spathulenol	1571	2154	-	0.1	0.1	a, c
63	Caryophyllene oxide	1578	2014	0.2	0.4	0.2	a, b, c
64	T-Cadinol	1639	2198	t	0.1	t	a, c
65	T-Muurolol	1640		t	0.1	-	a, c
66	α -Cadinol	1650	2259	t	-	t	a, c
67	Benzyle Benzoate	1763		t	-	-	a, c
	Total (%)			96.6	99.7	98.4	

¹ Composés classés dans l'ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5MS ; ²Indices de rétention relatifs aux n-alcane C₇-C₂₃ ; ³Identification : a, Comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; b, Comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; c, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique ; t : trace (<0.05%) ; * tentative d'identification.

Tableau 15 : Comparaison entre les teneurs (%) des composés majoritaires des huiles essentielles d'*Origanum floribundum*

Principaux composés	Echantillons de notre travail			Littérature	
	Chr�a (108a)	Hamam Mélouane (108a)	Kadiria	Chr�a (140)	Chr�a (108)
p-Cymène	18.5	24.9	15.5	12.4	31.5
γ - Terpinene	13.7	22.3	19.9	12.2	7.7
Thymol	8.4	27.3	33.6	1.1	9.9
Carvacrol	29.6	1.6	8.5	40.0	35.0
Total %	70.2	76.1	77.5	75.7	84.1

4.2.1.1.1. Composition des huiles essentielles extraites séparément à partir des feuilles et des fleurs

Généralement, les huiles essentielles de l'origan sont extraites à partir de la totalité de la plante (racines exclues). Dans le but de déterminer la contribution des feuilles et des fleurs séparément à la composition de l'huile essentielle nous avons réalisé l'extraction et l'analyse des huiles issues de ces deux parties de la plante. Nous avons précédemment signalé que la majorité de l'huile de cette espèce était fournie par les inflorescences.

Le tableau 16 rassemble les résultats de l'analyse de la composition chimique par GC et GC/MS des huiles essentielles des feuilles et des fleurs qui se caractérisent autant que l'huile de la plante entière par des teneurs élevées en monoterpènes et monoterpènes oxygénés qui à eux seuls constituent 93,6 et 95,5% des huiles essentielles des feuilles et des fleurs respectivement. Les principaux composés des huiles essentielles des feuilles et des fleurs sont le myrcène (5,1% et 3,3%), le p-cymène (22,3% et 9,6%), le γ -terpinene (17,4% et 24,3%) et le thymol (34,4% et 41,2%) respectivement, représentant 79,2% de la totalité de l'huile des feuilles et 78,4% des celle des fleurs.

Les huiles des deux parties de la plante contiennent plus ou moins les mêmes composés qui ne diff rent que par leurs teneurs. Une comparaison des huiles des deux parties de la plante montre que les huiles issues des feuilles comportent des quantités supérieures par rapport aux fleurs de 1-octen-3-ol (0,9% vs. 0,3%), de myrcène (5,1% vs. 3,3%), de p-cymène (22,3% vs. 9,6%), de linalool (1,8% vs. 0,7%), de methyl carvacrol (1,1% vs. 0,2%) et de β -caryophyllene (1,1% vs. 0,5%). Par contre, les huiles extraites à partir des inflorescences ont des teneurs supérieures en α -terpinene (3,7% vs. 1,0%), en γ - terpinene (24,3% vs. 17,3%), en thymol (41,2% vs. 34,4%) et en carvacrol (5,8% vs. 3,2%). Les composés : 2,4(10)-Thujadiene, verbenene, methyl thymol, alloaromadendrene et γ -cadinene n'ont été détectés que dans l'huile essentielle des feuilles, tandis que les constituants : thymyl acetate, α -gurjunene, germacrene D et β -bisabolene, sont présents uniquement dans celle des fleurs à l'état de traces. Une autre différence notable est la concentration du p-cymène et des sesquiterpènes dans les feuilles tandis que le γ - terpinene et le thymol sont plus importants dans les fleurs.

En conclusion, on peut dire que les différentes parties de la plante affectent non seulement le rendement en huile essentielle (tableau 11), mais aussi la composition de cette huile sans qu'elle perde sa principale caractéristique d'appartenir à un chémotype, telle que sa richesse en p-cymène, γ -terpinene et thymol.

Tableau 16 : composition (%) des huiles essentielles des feuilles et des fleurs d'*Origanum floribundum* de Kadiria

N°	Composés	<i>O. floribundum</i>	
		Feuilles	Fleurs
1	Ethyl n-valerate	t	-
2	(E)-2-Hexanal	t	-
3	3-Hexen-1-ol	t	-
4	3-Heptanone	t	t
5	Tricyclene	t	t
6	α -Thujene	2.7	2.9
7	α -Pinene	1.2	1.1
8	2,4(10)-Thujadien	t	-
9	Camphene	0.1	0.1
10	Verbenene	t	-
11	Sabinene	0.1	0.2
12	β -Pinene	0.3	0.2
13	1-Octen-3-ol	0.9	0.3
14	3-Octanone	0.1	t
15	β -Myrcene	5.1	3.3
16	3-Octanol	t	t
17	α -Phellandrene	0.5	0.4
18	δ -3-Carene	0.1	0.1
19	α -Terpinene	1.0	3.7
20	p-Cymene	22.3	9.6
21	Limonene	0.1	t
22	β -Phellandrene	0.3	0.7
23	1,8-Cineole	0.1	t
24	cis- β -Ocimene	0.2	0.1
25	trans- β -Ocimene	t	0.1
26	γ -Terpinene	17.3	24.3
27	cis-Sabinene hydrate	0.5	0.5
28	1-Nonen-3-ol	0.1	t
29	Terpinolene	0.1	0.1
30	p-Cymenyl	0.1	t
31	trans-Sabinene hydrate	0.1	t
32	Linalool	1.8	0.7
33	Borneol	0.1	t
34	4-Terpineol	0.5	0.1
35	α -Terpineol	0.3	0.1
36	Thymol methyl ether	0.1	-

37	Carvacrol methyl ether	1.1	0.2
38	Thymoquinone	t	-
39	Thymol	34.4	41.2
40	Carvacrol	3.2	5.8
41	Thymyl acetate	-	t
42	α -Gurjunene	-	t
43	β -Caryophyllene	1.1	0.5
44	α -Humulene	0.1	t
45	Allo-aromadendrene	t	-
46	Germacrene D	-	t
47	Bicyclogermacrene	-	t
48	β -Bisabolene	0.1	t
49	γ -Cadinene	t	-
50	δ -Cadinene	0.1	t
51	Germacrene D-4-ol	t	t
52	Spathulenol	0.1	t
53	Caryophyllene oxide	0.3	t
54	T.Cadinol	t	t
55	α -cadinol	t	t
	Total (%)	96.6	96.3
	Hydrocarbures monoterpéniques	51.5	46.9
	Monoterpènes oxygénés	42.1	48.6
	Hydrocarbures sesquiterpéniques	1.4	0.5
	Sesquiterpènes oxygénés	0.4	-
	Autres	2.3	0.3

4.2.1.2. *Origanum glandulosum*

L'analyse par CG et CG/SM des huiles essentielles des trois échantillons d'*O. glandulosum* de Souhane, Ouled Slama et Béjaïa (tableau 17) a permis l'identification de 41, 39 et 51 composés de ces huiles, respectivement. Les monoterpènes avec 90,3% (Souhane), 87,3% (Ouled Slama) et 96,0% (Béjaïa) constituent la quasi-totalité de chacune des huiles. Les principaux composés sont l' α -thujène, le p-cymène, le γ -terpinène et le thymol (fig. 58). Les trois échantillons sont riches en thymol et pauvres en carvacrol. Si l'on compare les principaux composés de ces huiles avec ceux de la même espèce, issus de différentes régions de l'Algérie et rapportés dans la littérature (tableau 18) on peut dire que nos résultats sont en accord avec ceux de la majorité des échantillons étudiés par les différents auteurs qui rapportent le **thymol** comme composé principal. Une différence majeure entre l'échantillon de Souhane et ceux de Béjaïa et d'Ouled Slama ainsi que ceux rapportés dans la littérature est que cet échantillon a une teneur élevée en γ -terpinène (23,9%) exactement égale à celle du thymol. On peut remarquer une certaine similitude entre les teneurs des principaux composés de notre échantillon d'Ouled slama (fig.59) et celui d'Ouled Iyiche (Sétif). Entre les échantillons que nous avons étudié et ceux que nous avons cité dans le tableau 18 ainsi que ceux relatifs à 13 autres échantillons d'origine commerciale que nous n'avons pas reporté dans ce tableau, une différence notable que nous avons relevé réside

dans le fait que dans nos échantillons l' α -thujène est à une teneur 4.0-8.0% tandis que dans tous les autres échantillons la teneur en ce composé varie entre des traces et 1.0%. Enfin, on peut dire que la composition de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* est très fluctuante, mais jusqu'à présent il a toujours été démontré qu'il y a une prédominance combinée du p-cymène, du γ -terpinène du thymol et/ou du carvacrol.

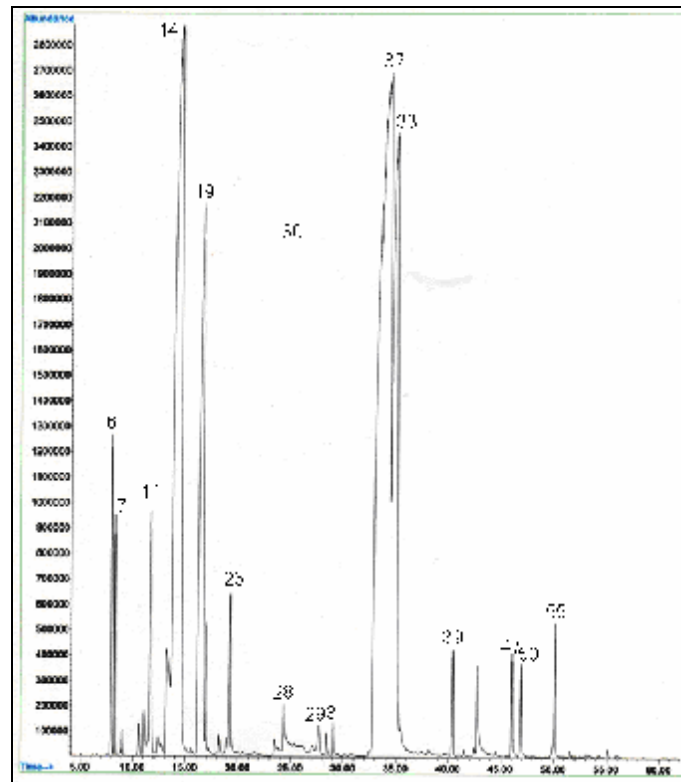
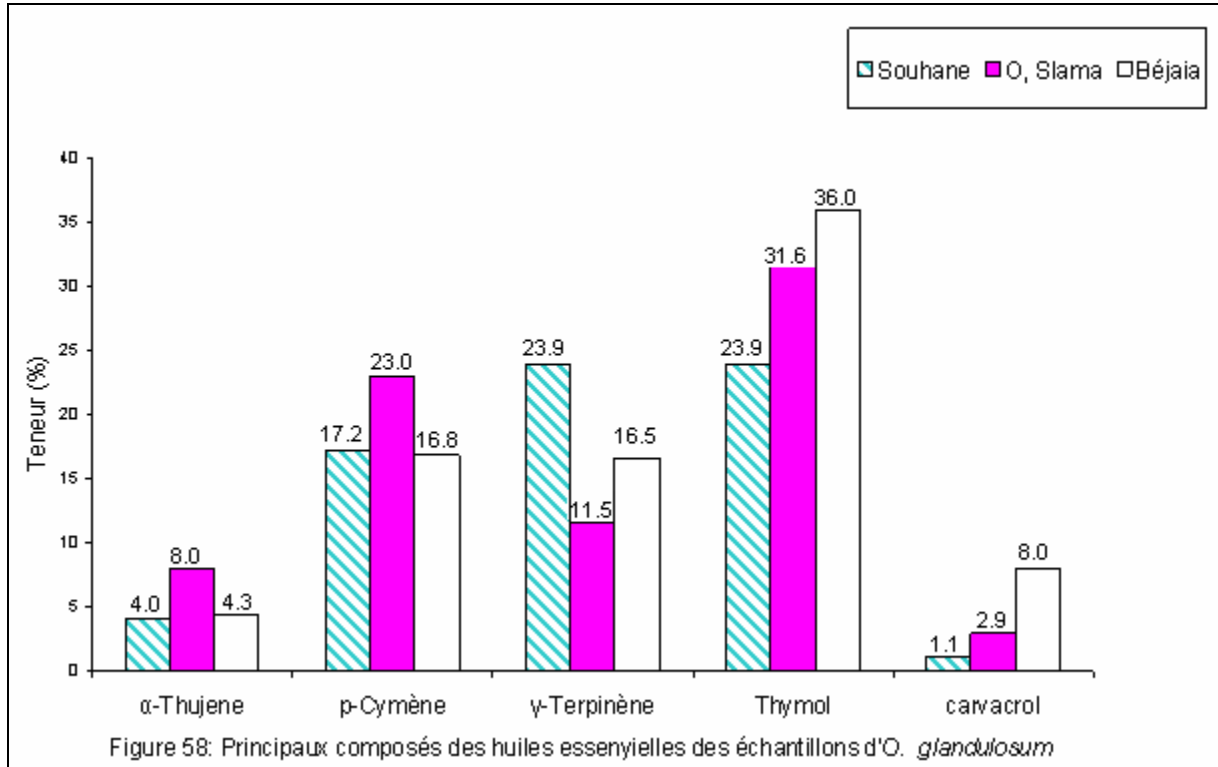


Figure 59 : Chromatogramme CG/SM d'*O. glandulosum* d'Ouled Slama

Tableau 17 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons d'*Origanum glandulosum*

N°	1 Composés	2 Indices de		<i>Origanum glandulosum</i>			3 Identification
		rétention		Souhane	Ouled Slama	Béjaïa	
		HP5MS	PEG				
1	Methyl isovalerate	765		t	t	t	a, c
2	(E)-2-Hexenal	850		0.1	-	0.1	a, c
3	3-hexen-1-ol	862		t	-	-	a, c
4	3-Heptanone	887		0.1	t	0.1	a, c
5	Tricyclene	923		-	t	-	a, c
6	α -Thujene	925	1029	4.0	8.0	4.1	a, c
7	α -Pinene	939	1026	2.4	0.3	1.2	a, b, c
8	Camphene	951	1072	0.1	-	0.2	a, b, c
9	Sabinene	973	1132	0.6	-	0.6	a, b, c
10	β - Pinene	978	1119	0.6	0.3	0.4	a, b, c
11	β -Myrcene	992	1173	4.0	2.6	4.1	a, b, c
12	α -Phellandrene	1007	1177	-	-	1.2	a, b, c
13	α -Terpinene	1017	1192	2.9	1.6	2.5	a, b, c
14	p-Cymene	1026	1290	17.2	23.0	16.8	a, b, c
15	Limonene	1044	1212	-	-	t	a, b, c
16	β - Phellandrene	1045	1222	-	-	t	a, b, c
17	1-8-Cineole	1046	1223	-	-	t	a, b, c
18	trans- β - Ocimene	1052	1272	-	-	t	a, c
19	γ - Terpinene	1060	1261	23.9	11.5	16.5	a, b, c
20	cis-Sabinene Hydrate	1075	1567	0.7	0.1	0.2	a, c
21	1- Nonen-3-ol	1088	1525	0.2	t	t	a, c
22	Terpinolene	1093	1300	0.3	0.4	0.2	a, b, c
23	p-Cymenyl	1095	1452	0.2	0.1	0.1	a, c
24	Methyl benzote	1099		t	-	t	a, c
25	trans-Sabinene Hydrate	1101	1482	t	0.1	t	a, c
26	Linalool	1104	1558	5.0	2.6	2.5	a, b, c
27	Borneol	1166	1732	0.2	-	t	a, b, c
28	Terpinen-4-ol	1177	1613	0.4	-	0.1	a, b, c
29	α -Terpineol	1190	1723	0.6	-	0.4	a, b, c
30	Thymol methylether	1235	1611	1.1	0.3	0.8	a, c
31	Carvacrol methylether	1245	1976	2.0	1.8	1.1	a, c
32	Thymol	1297	2212	23.9	31.6	36.0	a, b, c
33	Carvacrol	1317	2238	1.1	2.9	8.0	a, b, c
34	Thymyl acetate	1362	1949	0.1	0.1	t	a, c
35	Eugenol	1373	2192	0.1	t	t	a

36	Carvacryl acetate	1391		-	t	t	a
37	Geranyl acetate	1392	1778	t	-	t	a, b, c
38	cis-Jasmone	1406	1972	-	-	t	a, c
39	β -Caryophyllene	1417	1620	1.3	2.2	1.4	a, b, c
40	α -Bergamotene	1438	1563	t	0.1	t	a, c
41	α -Humulene	1452	1687	t	t	-	a, c
42	1,6,6-Trimethylbicyclo[3.3.0]octan-3-one *	1454		0.8	2.3	0.8	a
43	Germacrene D	1480	1742	-	-	t	a, b, c
44	α -Curcumene	1483	1790	-	0.1	-	a, c
45	Zingiberene	1494		-	t	-	a, c
46	α -Muuroolene	1497	1740	-	-	t	a, c
47	β -Bisabolene	1506	1748	0.6	0.9	0.1	a, c
48	γ -Cadinene	1511	1776	t	t	t	a, c
49	δ -Cadinene	1519	1772	t	-	0.1	a, c
50	β -Sesquiphellandrene	1525		0.2	0.7	t	a, c
51	α -Bisabolene	1540	1776	t	t	t	a, c
52	3-Hexenylbenzoate	1568		0.1	t	t	a, c
53	Germacrene D-4-ol	1569		-	-	t	a, c
54	Spathulenol	1571	2154	-	-	t	a, c
55	Caryophyllene Oxide	1578	2014	0.5	0.7	0.2	a, b, c
56	T-Cadinol	1639	2198	-	t	-	a, c
57	α -Cadinol	1650	2259	-	t	t	a, c
58	Benzyle benzoate	1763		-	t	-	a, c
59	Hexahydrofarnesyl acetone	1846	2131	-	t	-	a, c
	Composés identifiés (%)			95.3	94.3	99.8	
	Hydrocarbures monoterpéniques			56.2	47.8	47.9	
	Monoterpènes oxygénés			34.1	39.5	49.1	
	Sesquiterpenes hydrocarbons			2.1	4	1.6	
	sesquiterpenes oxygénés			0.5	0.7	0.2	
	Autres			2.3	2.3	1	

¹ Composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne non polaire HP5MS ; ² Indices de rétention relatifs aux n-alcanes C₇-C₂₃ ; ³ Identification : a, Comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; b, Comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; c, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique ; t : trace (<0.05%) ; * tentative d'identification.

Tableau 18 : Comparaison des teneurs (%) des composés majoritaires des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* Desf.

Composés	p-cymène	γ -terpinène	thymol	carvacrol	Référence
Souhane	17.2	23.9	23.9	1.1	
Ouled Slama	23.0	11.5	31.6	2.9	Ce travail
Béjaia	16.8	16.5	36.0	8.0	
Ouled Iyiche	25.8	6.1	36.7	18.6	
Djebel Megiss	15.8	11.6	37.8	22.6	(135)
Anini	18.8	4.8	10.7	53.2	
Tafat	3.6	13.2	7.7	63.7	
Setif	11.2	13.4	6.6	47.0	(231)
Sebdou (Tlemcen)	17.1	27.0	41.6	2.2	(138)
Bouhatem (Béjaia)	18.5	12.4	44.6	13.8	
Ain Abassa (Sétif)	14.6	11.7	55.6	7.6	
Matrouna (Sétif)	3.6	3.3	71.3	14.5	
Barrage Ain Abassa (sétif)	10.2	7.4	62.6	12.8	
Teskriou (Béjaia)	17.3	13.7	41.9	14.6	
Beni Mouhli (Sétif)	4.8	14.5	60.0	12.6	(230)
Trounna (Sétif)	5.9	5.7	62.8	19.0	
El Rouss (Sétif)	4.4	5.1	47.3	36.8	
Ain Touila (Sétif)	7.3	9.4	56.2	19.6	
Ain El Kbira (Sétif)	3.7	3.3	58.0	29.3	
Ouanougha (M'sila)	8.0	18.7	35.7	25.3	
Blida	6.7	8.7	31.2	2.4	(108)

4.2.2. Huiles essentielles de thym

4.2.2.1. *Thymus algeriensis*

L'analyse des 4 échantillons de *Thymus algeriensis* par CG et CG/SM nous a permis d'identifier un total de 149 composés (tableau 19). Cette analyse montre que les 4 échantillons ont des profils chimiques différents même pour des échantillons récoltés au même lieu (Chrèa) à deux altitudes différentes (800 et 1500 mètres). Ainsi, l'échantillon récolté à 800 mètres d'altitude est caractérisé par le **thymol** (29,5%), le **p-cymène** (13,0%) et le **γ -terpinène** (6,9%) comme composés principaux (tableau 20) suivis par l' α -pinène (5,8%), le β -caryophyllène (5,0%) et le caryophyllène oxide (5,0%). A première vue le profil chimique de cet échantillon est proche de ceux des *origanum glandulosum* étudiés auparavant et de manière générale de ceux des *Thymus* appartenant au chémotype à thymol où les 3 composés, thymol, p-cymène, et γ -terpinène forment la majorité de la composition. La prédominance combinée du **terpinyl acetate** (18,0%), du **nerolidol** (12,6%), du **α -Pinène** (11,1%), du **borneol** (9,0%) et du **bornyl acetate** (7,7%) caractérise quant à elle la composition chimique de l'échantillon récolté à 1500 mètres. Donc, pour une même espèce et un même lieu nous avons **deux chémotypes différents**. Ce résultat est en accord avec celui rapporté en 2002 par d'autres auteurs (108) pour *Thymus algeriensis* récolté aussi à Chrèa en deux positions différentes (tableau 21) et pour lequel il a été trouvé qu'un échantillon est riche

en **thymol** (62,7%) et l'autre riche en **linalool** (78,8%). Concernant l'échantillon récolté à El Asnam, le **4-terpineol** (10,6%), le **camphre** (10,1%), le **p-cymene** (9,9%), l' **α -pinene** (6,5%) et le **1-8-cineole** (6,5%) sont les constituants qui forment plus de 40% de l'huile essentielle. Enfin, l'huile essentielle de *T.algeriensis* issue de Tazmalt est très différente de celles des trois premières. En effet, cette huile se caractérise par le **géranyl acétate** (16,4%) comme composé le plus important suivi par trois composés dont la teneur est supérieure à 3.0% : **β -myrcene** (3,1%), **β -caryophyllene** (3,6%) et **caryophyllene oxide** (3,9%) ; le reste de l'huile est constitué par un grand nombre de composés dont les teneurs varient entre des traces et 2.6% (95a). La comparaison des résultats de la composition chimique des 4 échantillons étudiés (tableaux 19 et 20) et ceux rapportés dans la littérature pour la même espèce (tableau 21) nous permet de conclure que les échantillons de Chréa (1500m altitude) (fig 60), de Tazmalt (fig.61) et d'El Asnam (fig.62) appartiennent à de nouveaux chémotypes et que cette espèce présente un polymorphisme chimique qui a déjà été observé pour un certain nombre d'espèces de *Thymus* d'autres pays (122).

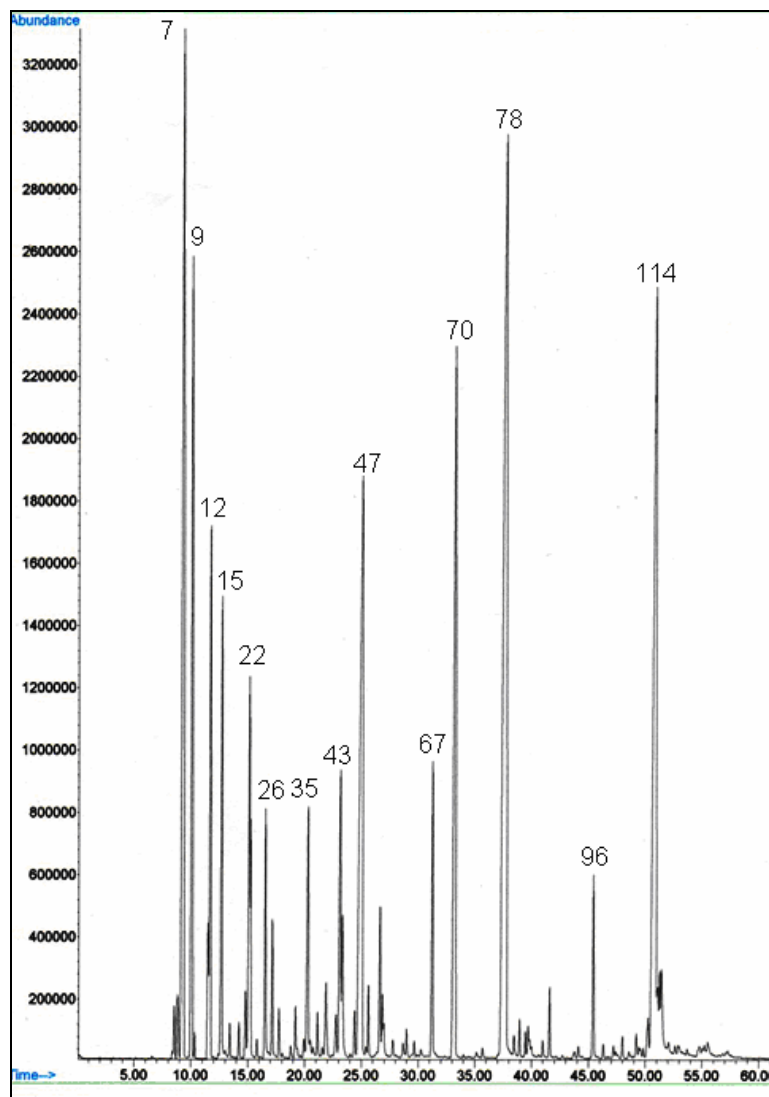


Figure 60 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Thymus algériensis* de Chréa (1500m)

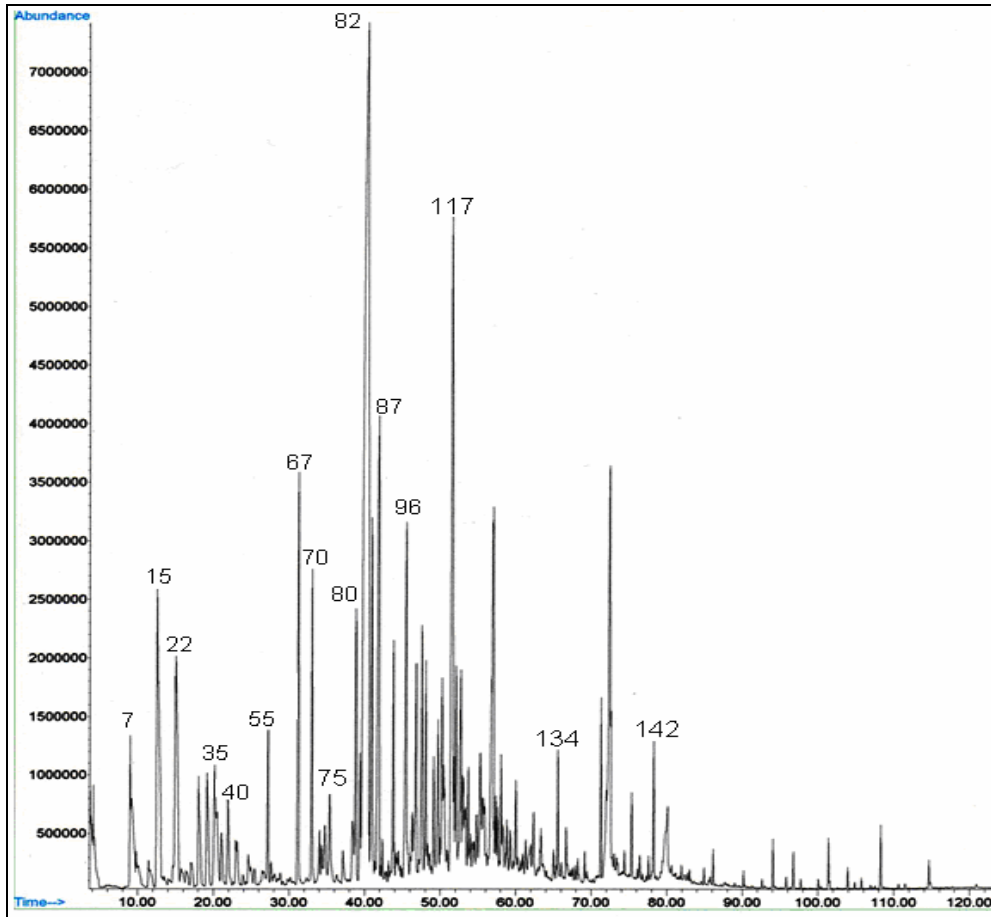


Figure 61 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* de Tazmalt

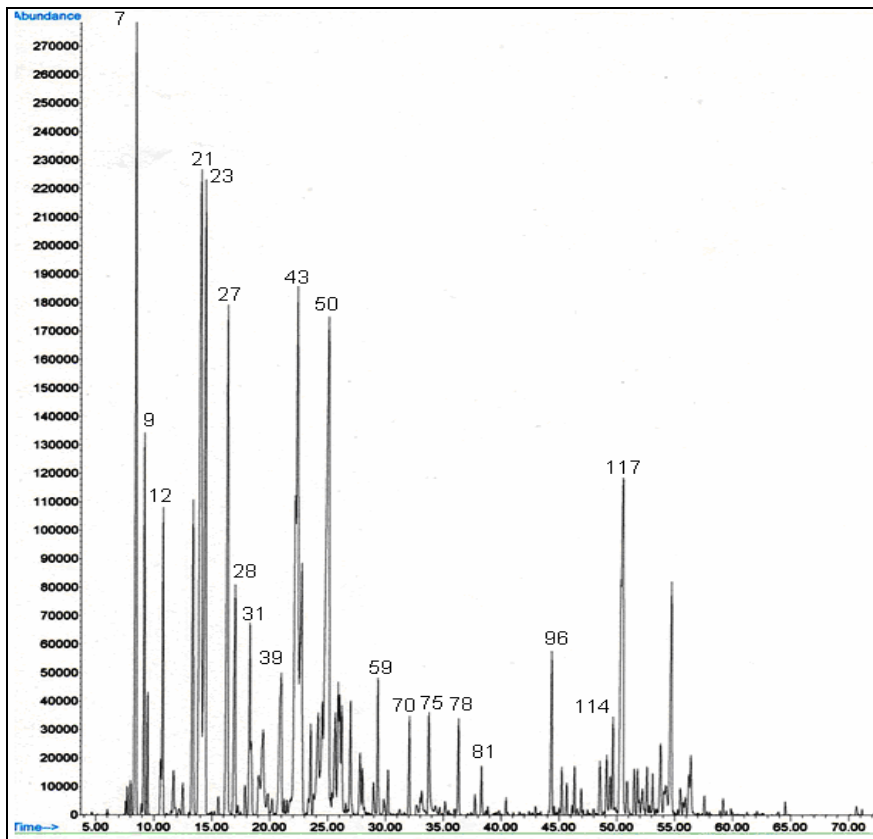


Figure 62 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* d'El Asnam (Bouira)

Tableau 19 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons de *Thymus algeriensis*

N°	¹ Composés	² IK			<i>Thymus algeriensis</i>			³ Identification
		HP5MS	PEG	Tazmalt	Chrèa 800m	Chrèa 1500m	El Asnam	
1	n-Octane	800	800	0.1	-	-	-	a, c
2	(E)-2-Hexenal	850	1090	-	t	-	-	a, c
3	Ethylbenzene	851		t	-	-	-	a, c
4	3-Hexen-1-ol	857		-	t	-	-	a, c
5	Tricyclene	923	1017	t	t	0.3	0.1	a, c
6	α -Thujene	925	1029	-	1.5	0.5	0.2	a, b, c
7	α -Pinene	935	1026	1.6	5.8	11.1	6.5	a, b, c
8	2,4(10)-thujadien	945		-	0.1	-	-	a, c
9	Camphene	948	1072	0.4	0.7	5.9	2.3	a, b, c
10	Verbenene	953	1121	-	0.1	0.1	0.6	a, c
11	Sabinene	972	1132	t	0.1	0.8	0.4	a, b, c
12	β -Pinene	976	1119	0.3	3.7	3.2	2.0	a, b, c
13	1-Octen, 3-Ol	982	1411	-	0.5	t	-	a, c
14	3-Octanone	987	1225	-	0.1	t	t	a, c
15	β -Myrcene	992	1173	3.1	1.9	3.0	0.3	a, b, c
16	n-Décane	1000	1000	0.1	-	-	-	a, c
17	3-Octanol	1001	1393	-	0.1	0.1	0.1	a, c
18	α -Phellandrene	1005	1177	0.8	0.2	0.2	0.2	a, b, c
19	δ -3-Carene	1009	1163	0.1	0.1	-	-	a, b, c
20	α -Terpinene	1017	1192	0.1	1.2	0.2	2.8	a, b, c
21	p-Cymene	1026	1290	0.1	13.0	0.4	9.9	a, b, c
22	Limonene	1029	1212	2.6	0.7	2.8	0.1	a, b, c
23	1,8-Cineole	1033	1223	0.2	1.5	1.0	6.5	a, b, c
24	Benzyl alcohol	1036		0.1	-	-	-	a, c
25	cis- β -Ocimene	1039	1246	0.2	0.1	0.1	-	a, c
26	trans- β -Ocimene	1048	1272	-	0.9	1.5	t	a, c
27	γ -Terpinene	1061	1261	0.3	6.9	0.8	5.5	a, b, c
28	cis-Sabinene hydrate	1069	1567	-	1.8	0.3	2.3	a, c
29	cis-Linaloloxide	1072	1480	0.9	0.1	-	t	a, c
30	1-Nonen-3-ol	1085	1525	-	-	-	0.2	a, c
31	Terpinolene	1087	1300	1.0	0.2	0.3	1.6	a, b, c
32	p-Cymenyl	1089	1452	-	0.1	-	0.6	a, c
33	trans-Sabinene Hydrate	1099	1482	-	0.2	0.1	0.5	a, c
34	Undécane	1100	1100	t	-	-	-	a, c
35	Linalool	1104	1558	0.9	3.6	2.0	1.2	a, b, c
36	α -Thujone	1106		0.6	-	-	-	a, c

37	Chrysanthenone	1110	1493	-	-	0.1	-	a, c
38	1-Octen-3-yl acetate	1116	1388	0.4	-	0.3	-	a, c
39	α -Campholenal	1125	1502	t	0.1	0.7	1.0	a, b, c
40	3-Octanyl acetate	1125		0.6	-	-	-	a, c
41	allo-Ocimene	1130		t	-	-	-	a, c
42	trans-Pinocarveol	1138	1664	t	0.4	0.4	-	a, c
43	Camphor	1144	1556	0.2	0.2	2.3	10.1	a, b, c
44	trans-Verbenol	1146	1683	0.3	0.4	1.2	3.6	a, c
45	Nerol oxide	1154		0.1	-	-	-	a, c
46	Pinocarvone	1162	1586	-	-	0.3	0.6	a, c
47	Borneol	1167	1732	0.2	-	9.0	1.6	a, b, c
48	p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1169	1674	-	-	-	1.3	a, c
49	Epoxylinolol	1170		0.1	-	-	-	a, c
50	Terpinen-4-ol	1177	1613	0.2	1.0	0.4	10.6	a, b, c
51	p-Cymen-8-ol	1187	1864	0.1	-	t	1.1	a, c
52	α -Terpineol	1194	1723	0.1	0.3	1.0	0.9	a, b, c
53	Myrtenal	1196	1649	-	-	0.4	1.0	a, c
54	Myrtenol	1198	1804	-	0.2	0.2	0.9	a, c
55	Dodecane	1200	1200	0.8	-	-	-	a, c
56	trans-Dihydrocarvone	1203	1647	-	0.1	-	t	a, c
57	Verbenone	1210	1734	0.1	-	0.1	0.9	a, c
58	Octyl acetate	1214		0.1	-	-	-	a, c
59	trans-Carveol	1221	1845	t	-	0.1	-	a, c
60	α -Fenchyl acetate	1227	1490	0.1	-	0.2	-	a, c
61	Nerol	1232	1808	-	-	t	-	a, b, c
62	Thymol methyl ether	1235	1611	t	1.2	0.1	-	a, c
63	Cuminaldehyde	1241	1815	0.1	0.1	t	0.2	a, b, c
64	Neral	1242	1694	-	0.1	-	0.6	a, b, c
65	Carvacrol methyl ether	1242	1976	0.1	0.3	-	0.9	a, c
66	Carvone	1246	1755	t	t	0.1	-	a, c
67	Lanallyl acetate	1258	1663	2.1	-	1.9	0.3	a, b, c
68	Geraniol	1259	1820	-	t	-	-	a, b, c
69	Geranial	1273		t	-	-	-	a, c
70	Bornyl acetate	1285	1608	1.4	-	7.7	0.7	a, b, c
71	Anethole	1287		t	-	-	-	a, c
72	Tridecane	1300	1300	0.3	-	-	-	a, c
73	Indole	1304		0.3	-	-	-	a, c
74	Thymol	1302	2212	0.5	29.5	t	0.2	a, b, c
75	Carvacrol	1318	2238	0.8	3.3	-	1.0	a, b, c
76	α -Cubebene	1346		0.3	-	-	-	a, c

77	Thymyl acetate	1352	1949	-	0.1	-	-	a, c
78	Terpinyl acetate	1356	1714	-	-	18.0	0.7	a, b, c
79	Neryl acetate	1366	1733	0.6	-	0.2	-	a, c
80	α -Copaene	1372	1509	1.3	t	0.2	0.1	a, c
81	β -Bourbonene	1380	1536	0.6	0.2	0.1	0.3	a, c
82	Geranyl acetate	1385	1770	16.4	-	0.2	-	a, b, c
83	β -Cubebene	1386	1549	-	-	0.1	-	a, c
84	β -Elemene	1389	1600	-	t	0.1	-	a, c
85	Tetradecane	1400	1400	2.0	-	-	-	a, c
86	α -Gurjunene	1403	1549	-	t	0.1	t	a, c
87	β -Caryophyllene	1415	1612	3.6	5.0	0.4	t	a, b, c
88	β -Gurjunene	1426	1532	0.2	0.1	-	-	a, c
89	α -Bergamotene	1435	1563	-	t	t	-	a, c
90	α -Cadinene	1441		0.1	-	-	-	a, c
91	α -Humulene	1450	1687	0.9	0.3	t	-	a, c
92	Geranyl acetone	1451	1848	0.1	-	-	-	a, c
93	trans- β -Farnesene	1456	1641	-	0.2	-	-	a, c
94	allo-Aromadendrene	1457	1663	0.1	-	0.1	-	a, c
95	γ -Muurolene	1472	1690	0.1	-	-	-	a, c
96	Germacrene D	1477	1726	2.0	0.7	1.1	1.3	a, c
97	α -Curcumene	1479	1790	0.2	-	-	-	a, c
98	β -Ionone	1482		0.2	-	-	-	a, c
99	Bicyclosesquiphellandrene	1485		t	-	-	-	a, c
100	Valencene	1487		0.2	-	-	-	a, c
101	Bicyclogermacrene	1492	1766	-	-	0.1	0.3	a, c
102	α -Muurolene	1495	1740	t	t	t	0.2	a, c
103	Pentadecane	1500	1500	1.3	-	-	-	a, c
104	β -Bisabolene	1505	1748	0.1	0.1	0.1	t	a, c
105	γ -Cadinene	1511	1776	1.0	-	0.1	-	a, c
106	Geranyl isobutyrate	1513		-	t	-	-	a, c
107	cis-Calamenene	1516	1835	0.1	-	-	-	a, c
108	δ -Cadinene	1518	1772	0.9	0.1	0.1	0.2	a, c
109	trans-Cadina-1-4-diene	1526	1757	0.2	-	-	-	a, c
110	α -Calacorene	1535		0.7	-	-	-	a, c
111	α -Bisabolene	1537	1776	-	-	0.2	-	a, c
112	Geranyl butyrate	1556		0.4	-	-	-	a, c
113	Palustrol	1558	1953	0.5	-	-	-	a, c
114	(E)-Nerolidol	1565	2050	-	-	12.6	0.6	a, b, c
115	Germacrene D-4-ol	1568		-	-	0.6	t	a, c

116	Spathulenol	1570	2154	-	-	-	1.8	a, c
117	Caryophyllene oxide	1573	2014	5.0	5.0	1.0	3.9	a, b, c
118	Globulol	1574	2098	-	-	-	0.2	a, c
119	β -Copene-4- α -ol *	1579		0.5	-	-	-	a
120	Viridiflorol	1587	2104	-	-	-	0.4	a, c
121	Hexadecane	1600	1600	0.7	-	-	-	a, c
122	Caryophylladienol *	1628	2290	-	0.4	-	-	a
123	T-Cadinol	1635	2198	0.2	-	0.1	-	a, c
124	T-Muurolol	1636		0.3	-	-	-	a, c
125	β -Eudesmol	1644	2255	1.1	-	0.1	-	a, c
126	α -Cadinol	1650	2259	0.6	-	0.2	0.7	a, c
127	Cadalene	1671		1.1	-	-	-	a, c
128	Heptadecane	1700	1700	0.5	-	-	-	a, c
129	(cis, trans) Farnesol	1701		-	0.1	-	-	a, c
130	Non identifié	1706		0.5	-	-	-	a
131	Tetradecanoic acid	1775		0.5	-	-	-	a, c
132	Octadecane	1802	1800	0.1	-	-	-	a, c
133	Farnesyl acetate	1847		0.7	-	-	-	a, c
134	Hexahydrofarnesyl acetone	1849	2131	0.5	-	-	-	a, c
135	Pentadecanoic acid	1876		0.1	-	-	-	a, c
136	Hexadecanol	1887		-	0.1	-	-	a, c
137	Nonadecane	1900		0.1	-	-	-	a, c
138	Palmitic acid	1982		2.3	-	-	-	a, c
139	Manoyl oxide	1992		2.0	-	0.1	-	a, c
140	Eicosane	2000	2000	0.1	-	-	-	a, c
141	Heneicosane	2100	2100	0.2	-	-	-	a, c
142	trans-Phytol	2121		0.6	t	-	-	a, c
143	Linoleic acid	2148		1.3	-	-	-	a, c
144	Docosane	2200	2200	0.1	-	-	-	a, c
145	1,19-Eicosadiene*	2228		0.1	-	-	-	a
146	Abieta-8,11,13-trien-7-one*	2292		0.1	-	-	-	a
147	Tricosane	2300	2300	0.1	-	-	-	a, c
148	Tetracosane	2400	2400	0.1	-	-	-	a, c
149	Pentacosane	2500		0.1	-	-	-	a, c
150	Heptacosane	2700		0.1	-	-	-	a, c
	Composés identifiés (%)			76.3	95.7	97.1	92.1	
	Monoterpenes			10.6	37.3	31.2	33.1	
	Monoterpenes oxygénés			26.7	44.5	48.0	48.7	
	Sesquiterpenes			13.8	6.7	2.8	2.4	
	Sesquiterpenes oxygénés			12.7	5.5	14.7	7.6	

0. Autres 12.5 1.0 0.4 0.3

¹ Composés classés dans l'ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5MS ; ²Indices de rétention relatifs aux *n*-alcane C₇-C₂₈ ; ³Identification : a, Comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; b, Comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; c, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique ; t : trace (<0.05%) ; * tentative d'identification.

Tableau 20 : Principaux composés (%) identifiés dans les 4 échantillons de *Thymus algeriensis*

Composés	<i>Thymus algeriensis</i>			
	Chrèa 800m	Chrèa 1500m	El asnam	Tazmalt (95a)
α -Pinene	5.8	11.1	6.5	1.6
Camphène	0.7	5.9	2.3	0.4
β - Pinene	3.7	3.2	2.0	0.3
β -Myrcene	1.9	3.0	0.3	3.1
p-Cymene	13.0	0.4	9.9	0.1
γ -Terpinene	6.9	0.8	5.5	0.3
1-8-Cineole	1.5	1.0	6.5	0.2
Linalool	3.6	2.0	1.2	0.9
Camphor	0.2	2.3	10.1	0.2
4-Terpineol	1.0	0.4	10.6	0.2
Borneol	-	9.0	1.6	0.2
Bornyl acetate	-	7.7	0.7	1.4
Thymol	29.5	t	0.2	0.5
Carvacrol	3.3	-	1.0	-
Terpinyl acetate	-	18.0	0.7	-
Geranyl acetate	-	0.2	-	16.4
β -Caryophyllene	5.0	0.4	t	3.6
Nerolidol	-	12.6	0.6	-
Caryophyllene oxide	5.0	1.0	3.9	3.9
Total (%)	81.1	78.0	63.6	33.1

Tableau 21 : Principaux composés (%) de *Thymus algeriensis* d'Afrique du nord rapportés dans la littérature

Composés	Algérie			Maroc (232)	Libye (233)
	Chrèa 1 (108)	Chrèa 2 (108)	Médéa (95)		
Myrcene	t	t	t	t	20.2
α -Terpinene	t	t	0.3	t	10.7
p-Cymene	8.8	2.2	6.8	0-36.0	t
Linalool	1.5	78.8	47.3	0.7-11	t
Thymol	62.7	4.7	29.2	14-65.1	12.5
Carvacrol	3.6	0.8	1.7	22.8-70.3	36.8

4.2.2.2. *Thymus numidicus* Poiret

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles des deux échantillons de *Thymus numidicus* a résulté en l'identification d'un total de 82 composés (tableau 22). Cette plante endémique Algéro-Tunisienne qui pousse principalement dans le Constantinois (Numidie) et la Kabylie (forêt de Yakourene) n'a connu la première étude de sa composition chimique qu'en 2004 par **Hadef et al.** (106). Cette étude a été suivie par une autre en 2005 par **Kabouche et al.** (97). Ces deux études sont relatives à des échantillons issus du Constantinois. Dans notre travail nous avons traité deux échantillons de Kabylie (Yakourene) dont l'un est issu du lieu connu localement par Tizi Nait Tizi tandis que l'autre est situé à environ 5Km de la position de récolte du premier échantillon. Il y a lieu de signaler ici que l'échantillon de Tizi Nait Tizi a été récolté durant la période de floraison tandis que l'autre a été récolté pendant le début de la période de feuillaison.

Les principaux composés identifiés dans le premier échantillon (figure 64) sont l' **α -terpinéol** (34,4%), le thymol (15,0%), le **γ -terpinene** (8,4%), le **carvacrol** (6,8%) et le **p-cymène** (6,7%).

Les composés les plus importants trouvés dans le second échantillon (figure 65) sont le **carvacrol** (28,1%) suivi par le **p-cymène** (8,0%), le **linalool** (5,6%) et un composé que nous avons tenté d'identifier comme étant le **1,6,6-trimethylbicyclo [3.3.0] octan-3-one** (5,2%). Ce dernier composé (figure 63) que nous avons déjà trouvé dans les huiles essentielles des deux espèces d'origan, est souvent trouvé dans les huiles essentielles des *Origanum* et des *Thymus* mais il est soit non indiqué soit signalé comme non identifié, soit comme tentative d'identification. Nous avons adopté cette dernière option car la spectrométrie de masse seule est insuffisante comme identification, d'autant plus qu'en figure 65 les fragments à $m/z = 123$ et 109 manquent et les fragments à $m/z = 77$ et 51 sont plutôt liés au groupement phényle (C_6H_5).

Les études précédemment citées, réalisées sur cette espèce du Constantinois (tableau 23) montrent une dominance très importante du **thymol** avec (60,8-68,2%) suivi du **carvacrol** (16,9%) et du **linalool** (11,5%) dans un cas, du **p-cymène** (10,3%) et du **linalool** (8,0%) dans l'autre cas. La comparaison des principaux composés de nos échantillons avec ceux du constantinois montre que les huiles essentielles de l'espèce *T. numidicus* de Kabylie appartiennent à deux **nouvelles races chimiques** (95a, 95c) différentes de celle du **chénotype à thymol** auquel appartiennent celles du constantinois. Par ailleurs, avoir comme composé principal du carvacrol suivi par du p-cymène et ou du γ -terpinene et du linalool est l'un des cas les plus fréquents chez les espèces du genre *Thymus*, mais avoir du α -terpinéol comme composé principal est relativement rare. En effet, sur plus de 373

huiles essentielles étudiées relatives à 162 espèces de thym de différents pays et répertoriées en 2002 par Stahl-Biskup (76), 7 d'entre elles ont l' α -terpinéol comme composé le plus important : *T. caespitatus* du Portugal (30,6-40,5%), *T. longicaulis* d'Italie (24,9%), *T. balcanus* de Roumanie (21,1%), *T. ciliatus* de Turquie (33,4%), *T. revolutus* de Turquie (30,5%), *T. dabivicus* de Mongolie (29,5%) et *T. nitens* de France (90%).

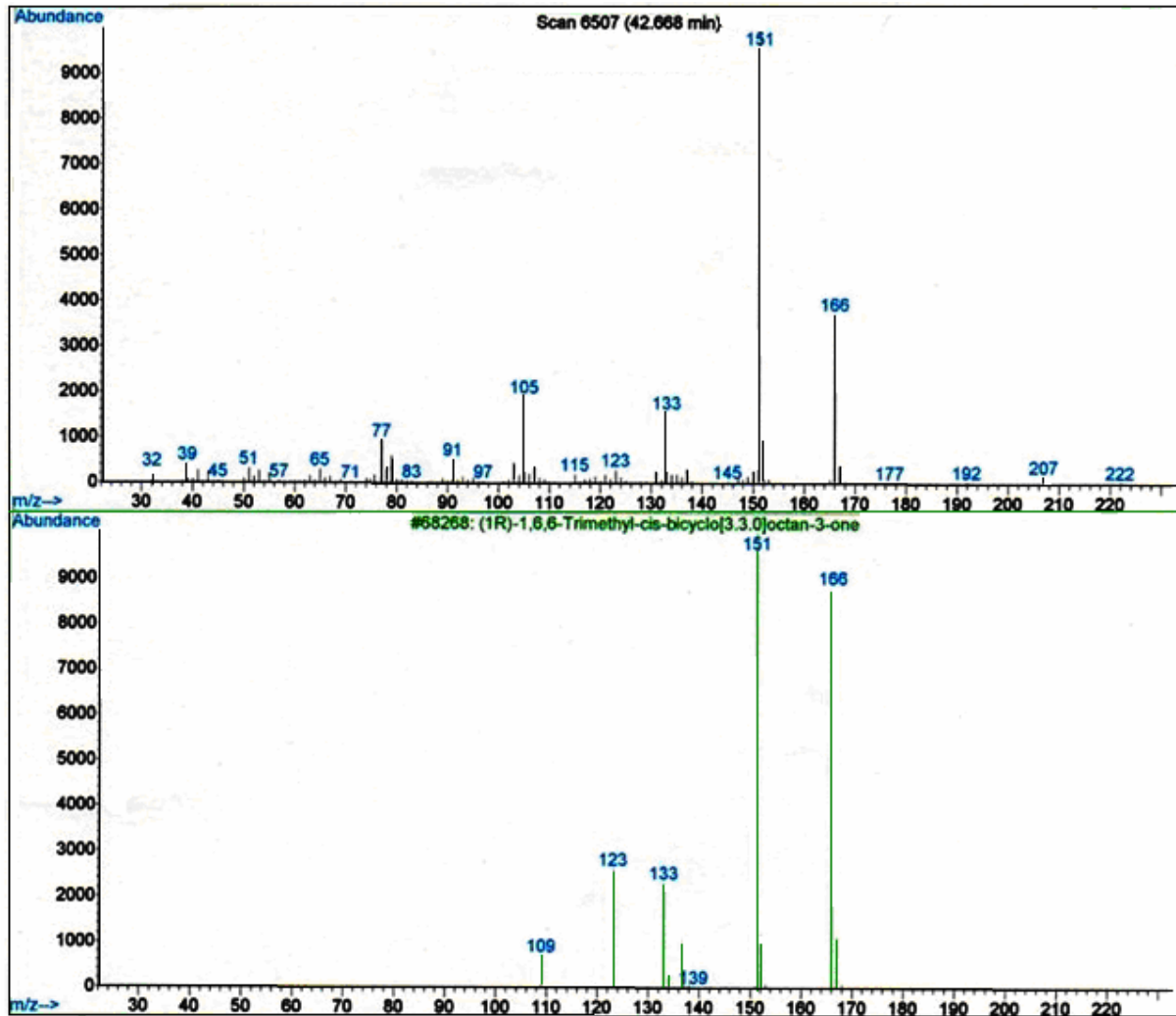


Figure 63 : Spectre de masse du 1, 6, 6-trimethylbicyclo [3.3.0] octan-3-one

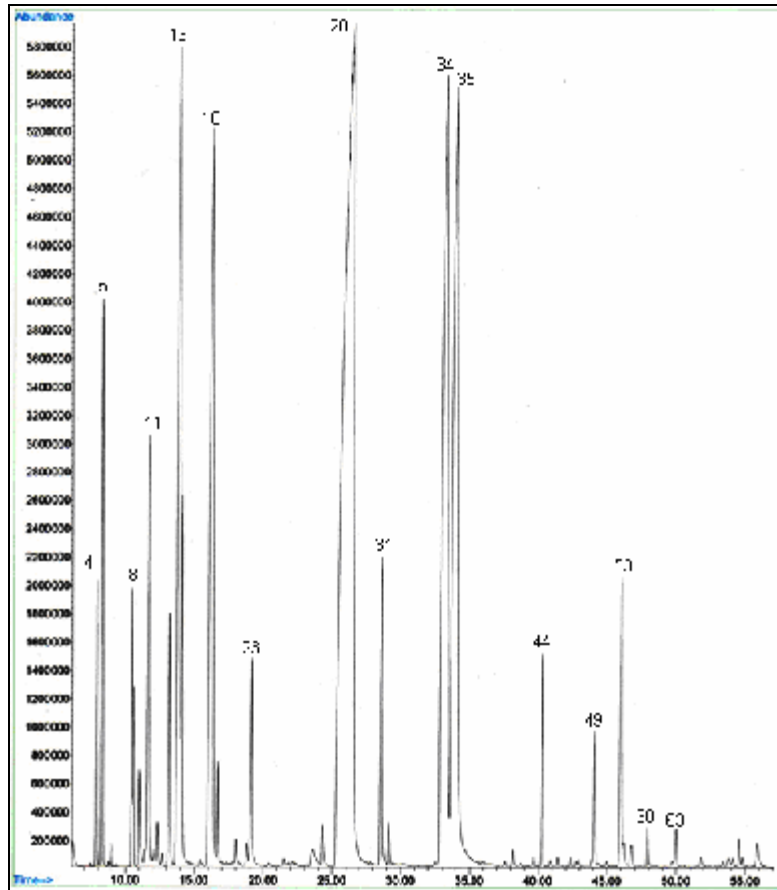


Figure 64 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. numidicus* à α -terpineol

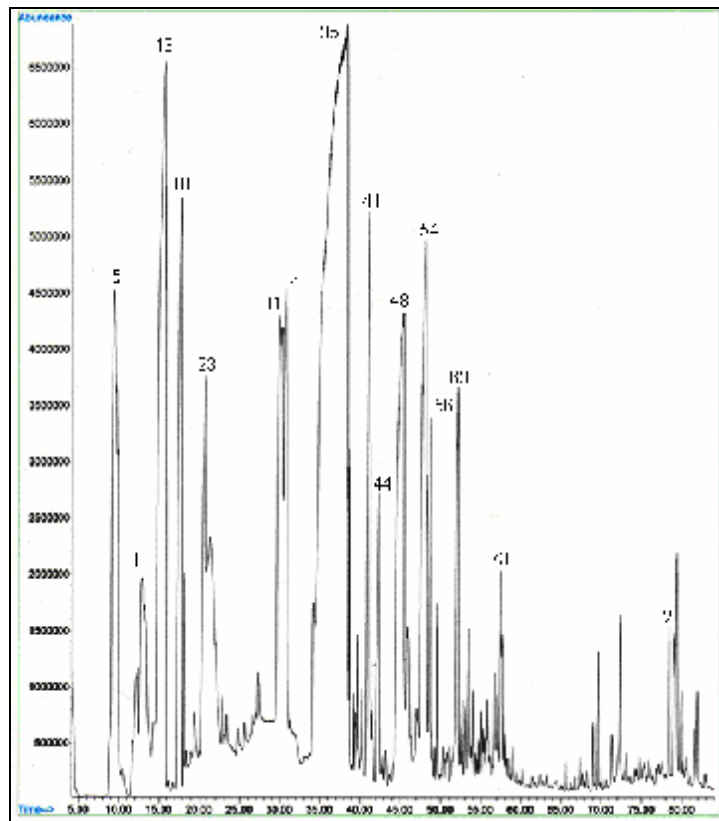


Figure 65 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. numidicus* à carvacrol

Tableau 22 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons de *Thymus numidicus*

N°	¹ Composés	² Indices de <i>T.</i>		<i>T.</i>		³ Identification
		rétention		<i>numidicus</i>	<i>numidicus</i>	
		HP5MS	PEG	1	2	
1	n- Octane	800	800	t	0.1	a, c
2	(E) -2- Hexenal	849	-	t	t	a, c
3	3-Heptanone	883	-	t	t	a, c
4	α -Thujene	925	1029	0.4	t	a, c
5	α -Pinene	932	1026	2.5	4.4	a, b, c
6	Camphene	945	1072	t	t	a, b, c
7	Verbenene	953	-	-	0.2	a, c
8	Sabinene	970	1132	1.2	t	a, c
9	β - Pinene	976	1119	t	0.2	a, b, c
10	1-Oten-3-Ol	982	1462	t	0.8	a, c
11	β -Myrcene	992	1173	3.7	2.3	a, c
12	α -Terpinene	1015	1192	0.8	0.4	a, b, c
13	p-Cymene	1024	1290	6.7	8.0	a, b, c
14	Limonene	1027	1212	-	t	a, b, c
15	1,8-Cineole	1034	1223	-	0.1	a, b, c
16	cis- β - Ocimene	1049	1246	-	0.1	a, c
17	trans- β - Ocimene	1052	1272	t	-	a, c
18	γ - Terpinene	1059	1261	8.4	3.3	a, b, c
19	cis-Sabinene Hydrate	1070	1075	0.6	0.3	a, c
20	Terpinolene	1085	1300	0.1	0.2	a, b, c
21	P-Cymenyl	1091	1452	-	0.5	a, c
22	trans-Sabinene Hydrate	1099	1482	t	0.1	a, c
23	Linalool	1104	1558	1.6	5.6	a, b, c
24	Pinocarveol	1137	1664	-	0.4	a, c
25	Verbenol	1145	1683	-	0.7	a, c
26	Borneol	1163	1732	0.1	0.5	a, b, c
27	Terpinen-4-ol	1177	1613	t	0.4	a, b, c
28	α -Terpineol	1191	1723	34.4	0.6	a, b, c
29	Dihydrocarvone	1197	1626	-	0.6	a, c
30	Dodecane	1200	1200	-	0.3	a, c
31	Thymol methyl ether	1236	1611	2.6	4.5	a, c
32	Carvacrol methyl ether	1245	1976	0.1	2.5	a, c
33	Thymoquinone	1258	2176	0.2	-	a, c
34	Thymol	1311	2212	15.0	0.7	a, b, c
35	Carvacrol	1318	2238	6.8	28.1	a, b, c
36	Thymyl acetate	1352	1949	t	-	a, c

37	Eugenol	1353	2172	-	0.3	a, b, c
38	Neryl acetate	1364	-	-	0.4	a, c
39	α -Copaene	1370	1509	t	0.7	a, c
40	β -Bourbonene	1379	1536	0.2	0.3	a, c
41	Geranyl acetate	1389	1769	-	2.5	a, b, c
42	β -Elemene	1394	1601	t	-	a, c
43	α -Gurjunene	1408	1549	0.1	-	a, c
44	β -Caryophyllene	1417	1620	2.6	1.2	a, b, c
45	β -Gurjunene	1426	-	-	0.1	a, c
46	α -Bergamotene	1437	1563	0.1	0.2	a, c
47	α -Humulene	1449	1651	t	t	a, c
48	1,6,6-Trimethylbicyclo[3. 3.0]octan-3-one *	1454	1734	1.1	5.2	a
49	GermacreneD	1477	1742	1.7	1.0	a, c
50	α -Curcumene	1479	1790	-	t	a, c
51	epi-bicyclosesquiphellandrene	1485	-	0.3	t	a, c
52	Valencene	1487	-	-	t	a, c
53	Pentadecane	1500	1500	0.3	0.5	a, c
54	β -Bisabolene	1506	1748	3.4	4.0	a, c
55	γ -Cadinene	1511	1776	0.2	0.4	a, c
56	δ -Cadinene	1518	1772	0.4	0.6	a, c
57	β -Sesquiphellandrene	1525	1768	t	0.3	a, c
58	Cadina -1, 4 - diene	1526	1799	-	t	a, c
59	α -Calacorene	1535	-	-	t	a, c
60	α - Bisabolene	1540	-	0.4	0.3	a, c
61	Palustrol	1559	-	-	0.3	a, c
62	Germacrene D-4-ol	1569	-	0.1	-	a, c
63	Caryophyllene Oxide	1574	2014	0.3	1.7	a, b, c
64	β - Copaene-4- α -ol *	1579	-	-	t	a
65	Viridiflorol	1587	-	-	0.1	a, c
66	Hexadecane	1600	-	t	0.2	a, c
67	Caryophylladienol*	1629	2380	-	0.1	a
68	T-Cadinol	1635	2198	0.1	0.2	a, c
69	T-Muurolol	1636	-	t	t	a, c
70	β -Eudesmol	1644	2260	0.1	0.1	a, c
71	α -Cadinol	1650	2259	0.1	0.4	a, c
72	Cadalene	1671	-	-	0.4	a, c
73	α -Bisabolol	1680	-	0.4	0.9	a, c
74	Heptadecane	1700	-	t	0.1	a, c
75	Non identifié	1706	-	-	0.1	

76	Octadecane	1802	1800	-	0.1	a, c
77	Hexahydrofarnesyl acetone	1849	2131	-	0.1	a, c
78	Cyclohexadecane	1885	-	-	0.1	a
79	Nonadecane	1900	1900	-	0.1	a, c
80	Palmitic acid	1982	-	t	0.5	a, c
81	Manoyl oxide	1991	-	-	0.1	a, c
82	trans-Phytol	2121	-	t	0.4	a, c
Composés identifiés (%)					97.7	90.0
Monoterpenes					24.0	19.6
Monoterpenes oxygénés					61.4	48.3
Sesquiterpenes					9.4	9.5
Sesquiterpenes oxygénés					1.1	3.4
Autres					1.8	9.2

¹ Composés classés dans l'ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5MS ; ² Indices de rétention relatifs aux *n*-alcanes C₇-C₂₄ ; ³ Identification : a, Comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; b, Comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; c, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique ; t : trace (<0.05%) ; * tentative d'identification.

Tableau 23 : Principaux composés des huiles essentielles de *T. numidicus* d'Algérie

Principaux composés	Echantillons de ce travail			Littérature	
	<i>T. numidicus 1</i> (Yakourene- Nait Tizi)	Tizi	<i>T. numidicus 2</i> (yakourene)	Berrahal (Constantine) (97)	Djebel Ouahch (Constantine) (106)
α -Pinene	2.5		4.4	1.1	t
β -Myrcene	3.7		2.3	-	-
p-Cymene	6.7		8.0	10.3	1
γ - Terpinene	8.4		3.3	7.6	0.3
Linalool	1.6		5.6	8.0	11.5
α -Terpineol	34.4		0.6	-	0.3
Methyl thymol	2.6		4.5	-	-
Thymol	15.0		0.7	60.8	68.2
Carvacrol	6.8		28.1	5.1	16.9
1, 6,6-Trimethylbicyclo [3. 3.0] octan-3-one	1.1		5.2	-	-
β -Bisabolene	3.4		4.0	-	-

4.2.2.3. *Thymus munbyanus*, *Thymus guyonii* et *Thymus dréatensis*

L'analyse par CG et CG/MS des huiles essentielles des espèces : *T. munbyanus*, *T. dréatensis* et *T. guyonii* ; a abouti à l'identification de 90 composés au total (Tableau 24) dont 58 correspondent à l'huile essentielle de *T. munbyanus*, 59 à celle de *T. dréatensis* et 64 à celle de *T. guyonii*. A notre connaissance ces trois espèces sont étudiées pour la première fois.

L'examen des principaux composés des huiles essentielles des trois espèces (tableau 25) montre que chacune est différente des deux autres. Ainsi, l'huile essentielle de *T. munbyanus* se caractérise par une composition classique typique des huiles des *Thymus* appartenant au chémotype à thymol dont les principaux composés qui forment la plus grande partie des teneurs des différents constituants de l'huile sont généralement le thymol suivi du p-cymène, du γ -terpinène et du carvacrol ou un composé autre que ce dernier. La composition chimique de *T. munbyanus* est caractérisée par le **thymol** (37,7%) suivi par le **p-cymène** (14,2%), le **γ -terpinène** (10,2%) et le **carvacrol** (8,4%) (95c).

Les composés les plus importants de *T. dréatensis* et qui forment à eux seuls **70,2%** de l'huile essentielle sont le **linalool** (30,4%), le **thymol** (20,2%) et le **geraniol** (19,6%). Les huiles essentielles des *Thymus* de différents pays et d'Algérie ayant le linalool comme composé le plus important, sont nombreux ; on peut citer à titre d'exemple *T. albicans* d'Espagne avec 51.1% de linalool, *T. serpyllium* de Finlande (33.0%), *T. capitellatus* du Portugal (31.6%) et *T. algeriensis* d'Algérie (47.3%). Le **geraniol** (19,6%) se trouve dans cette espèce à un taux équivalent à celui du **thymol** (20.2%). La présence de ce composé à un taux aussi élevé est très remarquable dans la mesure où sa présence dans les *Thymus* d'Algérie n'a jamais été détectée auparavant même à l'état de traces. Cette particularité de contenir un taux aussi élevé en geraniol à côté du linalool n'a pas encore été révélée, à notre connaissance, dans les nombreux *Thymus* appartenant au chémotype contenant le linalool comme composé le plus important. Cette espèce contient le taux le plus élevé en monoterpènes oxygénés (76.3%) parmi toutes les espèces que nous avons étudié dans ce travail et la teneur la plus faible en monoterpènes (13.3%) après *T. algeriensis* de tazmalt (10.6%).

Thymus guyonii est une espèce endémique Algérienne dont l'habitat naturel est le Sahara septentrional. La composition chimique de l'huile essentielle de cette espèce se caractérise par le **p-cymène** (18,6%) comme composé qui a la plus haute teneur suivi par le **γ -terpinène** (13,0%), le **thymol** (10,9%) et le **methyl thymol** (10,7%). Autant que je le sache, c'est la première espèce de *Thymus* d'Algérie pour laquelle le p-cymène est trouvé comme composé ayant la plus grande teneur. Les huiles essentielles des *Thymus* appartenant au chémotype à p-cymène sont nombreuses et nous avons dénombré 21 espèces de différents pays ayant le p-cymène comme composé le plus important, par exemple *T. nitens* de France (30,0%), *T. zygis* du Maroc (50,6%), *T. ericoides* d'Espagne (51,1%), *T. villosus* du Portugal (24,0%) (76). La particularité de *T. guyonii* par rapport aux autres *Thymus* ayant le p-cymène comme composé le plus important est la teneur élevée en **methyl thymol** (10,7%) équivalente à celle du thymol (10,9%) (95c).

Tableau 24 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons de *T. dreatensis*, *T. munbyanus* et *T. guyonii*

N°	1Composés	2IK		<i>T. dreatensis</i>	<i>T. munbyanus</i>	<i>T. Guyonii</i>	3Identification
		HP5MS	PEG				
1	Methylisovalerate	765		-	t	-	a, c
2	(E)-2-Hexenal	850	1090	-	t	-	a, c
3	3-Heptanone	886		-	t	t	a, c
4	Tricyclene	923	1017	-	-	t	a, c
5	α -Thujene	925	1029	0.2	1.5	2.1	a, b, c
6	α -Pinene	935	1026	1.2	4.6	1.7	a, b, c
7	Camphene	948	1072	t	t	2.5	a, b, c
8	Sabinene	972	1132	0.1	t	0.2	a, b, c
9	β -Pinene	976	1119	0.1	1.0	1.7	a, b, c
10	1-Octen, 3-Ol	982	1411	-	0.1	-	a, c
11	3-Octanone	987	1225	t	-	-	a, c
12	β -Myrcene	992	1173	2.5	7.1	0.1	a, b, c
13	3-Octanol	1001	1393	0.1	-	-	a, c
14	α -Phellandrene	1005	1177	0.1	0.5	-	a, b, c
15	δ -3-Carene	1009	1163	t	-	-	a, b, c
16	α -Terpinene	1017	1192	0.4	0.5	2.2	a, b, c
17	p-Cymene	1026	1290	4.0	14.2	18.6	a, b, c
18	Limonene	1029	1212	0.3	0.3	0.2	a, b, c
19	β -Phellandrene	1030	1222	t	0.2	0.2	a, c
20	1,8-Cineole	1033	1223	-	0.1	0.5	a, b, c
21	cis- β -Ocimene	1039	1246	-	t	-	a, c
22	trans- β -Ocimene	1048	1272	t	t	-	a, c
23	γ -Terpinene	1061	1261	4.4	10.1	13.0	a, b, c
24	cis-Sabinene hydrate	1069	1567	0.1	0.5	0.4	a, c
25	1-Nonen-3-ol	1085	1525	t	-	0.1	a, c
26	Terpinolene	1087	1300	t	0.2	0.3	a, b, c
27	p-Cymenényl	1089	1452	-	0.1	0.2	a, c
28	trans-Sabinene Hydrate	1099	1482	-	t	t	a, c
29	Linalool	1104	1558	30.4	2.2	6.1	a, b, c
30	Camphor	1144	1556	-	-	t	a, b, c
31	trans-Verbenol	1146	1683	t	-	-	a, c
32	trans-Chrysanthemal	1149		0.1	-	-	a, c
33	Borneol	1167	1732	t	t	6.1	a, b, c
34	Terpinen-4-ol	1177	1613	0.1	0.1	-	a, b, c
35	α -Terpineol	1194	1723	2.5	t	t	a, b, c

36	cis-Dihydrocarvone	1197	1626	0.1	-	-	a, c
37	trans-Dihydrocarvone	1203	1647	t	-	-	a, c
38	Nerol	1232	1808	0.2	-	-	a, b, c
39	Thymol methyl ether	1235	1611	0.7	1.4	10.7	a, c
40	Cuminaldehyde	1241	1815	0.3	-	-	a, b, c
41	Neral	1242	1694	0.6	-	-	a, b, c
42	Carvacrol methyl ether	1242	1976	-	0.2	0.3	a, c
43	Geraniol	1259	1820	19.6	-	-	a, b, c
44	Bornyl acetate	1285	1608	-	-	t	a, b, c
45	Thymol	1302	2212	20.2	37.7	10.9	a, b, c
46	Carvacrol	1318	2238	1.1	8.4	4.2	a, b, c
47	α -Cubebene	1366		-	-	t	a, c
49	Eugenol	1353	2172	-	t	t	a, c
48	Terpinyl acetate	1356	1714	-	-	0.1	a, b, c
50	Neryl acetate	1366	1733	-	-	t	a, c
51	α -Copaene	1372	1509	t	0.1	0.1	a, c
52	β -Bourbonene	1380	1536	0.1	0.1	t	a, c
53	Geranyl acetate	1385	1770	0.3	0.2	-	a, b, c
54	β -Elemene	1389	1600	-	t	0.1	a, c
55	α -Gurjunene	1403	1549	0.1	-	-	a, c
56	cis-Jasmone	1406	1972	-	t	-	a, c
57	Methyl eugenol	1410	2025	-	-	0.1	a, c
58	β -Caryophyllene	1415	1612	3.0	2.9	3.7	a, b, c
59	β -Gurjunene	1426	1532	0.1	-	t	a, c
60	α -Bergamotene	1435	1563	t	t	0.1	a, c
61	Aromadendrene	1437	1625	t	-	0.1	a, c
62	α -Humulene	1450	1687	0.1	0.2	0.3	a, c
63	1,6,6-Trimethylbicyclo[3.3.0] octan-3-one *	1454	1734	-	0.2	t	a
64	allo-Aromadendrene	1457	1663	0.1	-	0.4	a, c
65	γ -Muuroolene	1472	1690	-	t	0.1	a, c
66	Germacrene D	1477	1726	1.8	1.0	0.2	a, c
67	epi-bicyclosesquiphellandrene	1485	-	-	t	-	a, c
68	Valencene	1490		-	t	t	a, c
69	Bicyclogermacrene	1492	1766	t	-	0.5	a, c
70	α -Muuroolene	1495	1740	t	0.1	0.2	a, c
71	β -Bisabolene	1505	1748	0.7	0.1	2.5	a, c
72	γ -Cadinene	1511	1776	t	0.1	0.3	a, c
73	δ -Cadinene	1518	1772	0.1	0.2	0.5	a, c

74	β -Sesquiphellandrene	1525	1770	t	-	-	a, c
75	trans-Cadina-1-4-diene	1526	1757	t	t	0.1	a, c
76	α -Cadinene	1532		-	t	-	a, c
77	α -Calacorene	1536		-	t	-	a, c
78	α -Bisabolene	1537	1776	0.1	-	0.1	a, c
79	Palustrol	1558	1953	0.3	-	-	a, c
80	Germacrene D-4-ol	1568	-	0.2	-	0.2	a, c
81	Spathulenol	1570	2154	-	-	1.4	a, c
82	Caryophyllene oxide	1573	2014	0.2	0.6	0.5	a, b, c
83	Viridiflorol	1587	2104	-	-	0.1	a, c
84	Caryophylladienol*	1628	-	-	t	0.1	a
85	T-Cadinol	1635	2198	t	t	0.4	a, c
86	T-Muurolol	1636		-	t	0.2	a, c
87	β -Eudesmol	1644	2255	t	0.1	0.2	a, c
88	α -Cadinol	1650	2259	t	0.1	0.4	a, c
89	Hexahydrofarnesylacetone	1846	2131	-	-	t	a, c
90	trans-Phytol	2121	-	-	-	t	a, c
	Composés identifiés (%)			96.6	97.1	95.3	
	Monoterpenes			13.3	40.3	43.0	
	Monoterpenes oxygénés			76.3	50.8	39.4	
	Sesquiterpenes			6.2	4.8	9.3	
	Sesquiterpenes oxygénés			0.7	0.8	3.5	
	Autres			0.1	0.4	0.1	

¹ Composés classés dans l'ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5MS ; ² Indices de rétention relatifs aux *n*-alcanes C₇-C₂₄ ; ³ Identification : a, Comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; b, Comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; c, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique ; t : trace (<0.05%) ; * tentative d'identification.

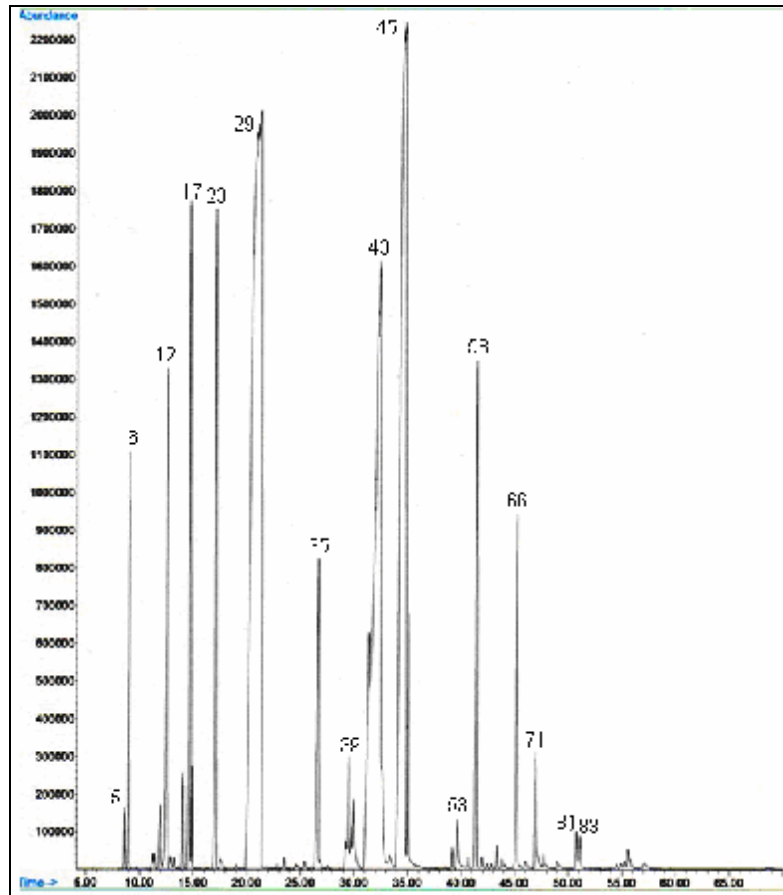


Figure 66 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. dreatensis*

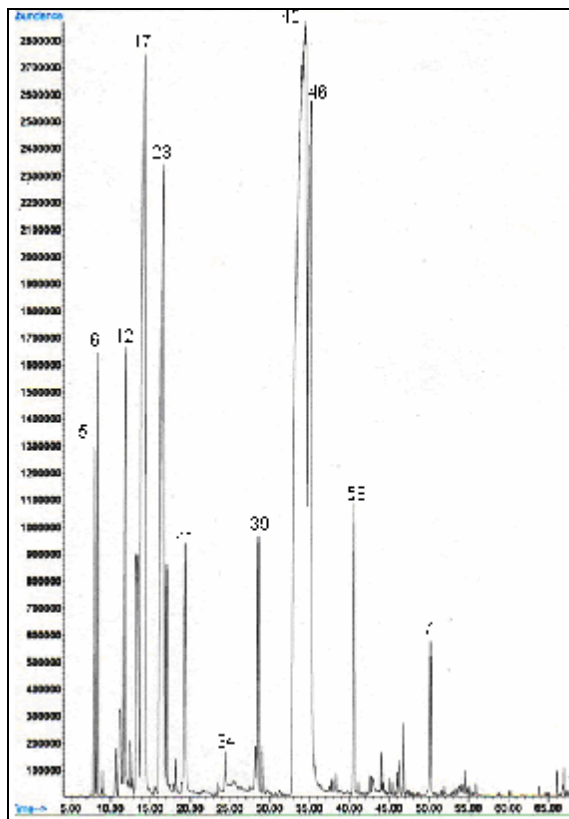


Figure 67 : chromatogramme de l'huile essentielle de *T. munbyanus*

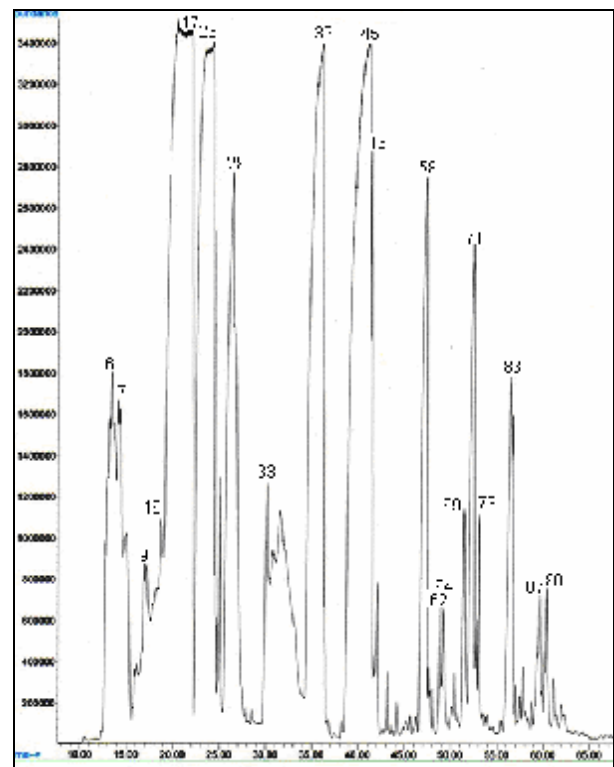


Figure 68 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. guyonii*

Tableau 25 : Principaux composés des espèces *T. munbyanus*, *T. dreatensis* et *T. guyonii*

Composés	Espèces de <i>Thymus</i>		
	<i>munbyanus</i>	<i>dreatensis</i>	<i>guyonii</i>
α -Pinene	4.6	1.2	1.7
β -Myrcene	7.1	2.5	0.1
p-Cymene	14.2	4.0	18.6
γ -Terpinene	10.1	4.4	13.0
Linalool	2.2	30.4	6.1
Borneol	t	t	6.1
Methyl thymol	1.4	0.7	10.7
Geraniol	-	19.6	-
Thymol	37.7	20.2	10.9
Carvacrol	8.4	1.1	4.2

4.2.2.4. *Thymus pallescens* de Noé

Thymus pallescens de Noé anciennement connu sous le nom de *Thymus fontanesii* Boiss. et Reuter (73) est une espèce endémique Algérienne la plus répandue en Algérie après *T. algeriensis*, mais elle est de loin la plus abondante. Donc, c'est une espèce qui nous paraît être la mieux placée pour une éventuelle exploitation industrielle pour la production d'huile essentielle de thym en Algérie. Pour ces raisons nous allons étudier cette espèce avec un peu plus de détails comparativement aux autres espèces d'autant plus que nous avons précédemment trouvé qu'elle possède les meilleurs rendements en huiles essentielles. Malgré son abondance et sa répartition sur tout le nord Algérien, nous n'avons trouvé aucune donnée concernant la composition chimique de l'huile essentielle de cette espèce.

4.2.2.4.1. *Thymus pallescens* de différentes origines

Cette partie concerne la composition chimique des huiles essentielles de **6 échantillons** de *Thymus pallescens* récoltés de différentes régions de la partie centrale du pays à savoir **Tablat** (Médéa), **Sidi Aissa**, **Boussaâda**, **Kadiria** (Bouira), **El Asnam** (Bouira) et **Oued Rhiou**.

L'analyse par CG et CG/SM des huiles essentielles de ces échantillons a abouti à l'identification d'un total de 82 composés dont 54, 71, 66, 73, 56 et 65 correspondent aux huiles essentielles des plantes issues de Sidi Aissa, Boussaâda, Oued Rhiou, Kadiria, El Asnam et Tablat respectivement (tableau 26).

Les compositions de tous les échantillons sont similaires et contiennent les mêmes constituants qui ne diffèrent entre eux que par leurs teneurs. Les principaux composés sont le **p-cymene** (10,0-17,3%), le **γ -terpinene** (10,8-16,6%) et le **carvacrol** (41,5-57,7%). *T. pallescens* de Oued Rhiou se distingue des 5 autres échantillons non seulement par son rendement en huile essentielle exceptionnellement élevé (6,2%), mais aussi par le fait que c'est le **thymol** (49,3%) qui est le composé principal et non pas le **carvacrol** (9,0%). Donc, de manière générale on peut dire que cette espèce, à l'opposé de celle de *Thymus algeriensis*, se caractérise par une grande stabilité dans sa composition chimique et que le chémotype ayant le **p-cymene**, le **γ -terpinene** et le **carvacrol** comme composés principaux semble être le plus répandu, du moins dans la partie centrale du pays.

Tableau 26 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons de *T. palleescens* de différentes régions

N°	¹ Composés	² IK <i>Thymus palleescens</i>								⁴ Identification
		HP5 MS	PEG	³ TP1	³ TP2	³ TP3	³ TP4	³ TP5	³ TP6	
1	Ethyl n-valerate	847	-	t	t	t	-	-	a, c	
2	3-Hexen-1-ol	857	-	t	t	-	-	-	a, c	
4	1-Hexanol	867	-	t	t	t	-	-	a, c	
5	3-Heptanone	886	-	t	t	t	-	t	a, c	
6	Tricyclene	923	1017	t	t	t	t	t	a, c	
7	α -Thujene	925	1029	2.5	2.7	2.2	2.2	1.4	2.7	a, b, c
8	α -Pinene	935	1026	2.3	2.0	1.6	5.1	1.1	2.6	a, b, c
9	2,4(10)-thujadien	945	-	t	t	t	-	-	a, c	
11	Camphene	948	1072	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	a, b, c
12	Verbenene	953	1121	-	t	t	t	-	t	a, c
13	Sabinene	972	1132	t	0.2	t	0.2	0.1	0.6	a, b, c
14	β -Pinene	976	1119	0.3	0.4	0.3	0.5	0.1	0.4	a, b, c
15	1-Octen, 3-Ol	982	1411	t	0.3	0.2	0.3	0.1	t	a, c
16	3-Octanone	987	1225	t	t	t	t	0.1	t	a, c
17	β -Myrcene	992	1173	2.0	2.8	2.4	3.2	1.5	3.2	a, b, c
18	3-Octanol	1001	1393	t	t	t	0.1	0.1	t	a, c
19	α -Phellandrene	1005	1177	0.3	0.5	0.3	0.4	0.2	0.8	a, b, c
20	δ -3-Carene	1009	1163	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	t	a, b, c
21	α -Terpinene	1017	1192	2.7	3.7	2.6	2.3	1.8	1.0	a, b, c
22	p-Cymene	1026	1290	17.3	10.0	11.2	12.0	10.3	16.2	a, b, c
23	Limonene	1029	1212	0.1	0.1	0.8	0.1	-	0.3	a, b, c
24	β -Phellandrene	1030	1222	0.2	0.1	t	0.2	0.8	0.3	a, c
25	1,8-Cineole	1033	1223	0.1	0.1	t	0.1	-	0.2	a, b, c
26	cis- β -Ocimene	1039	1246	t	t	t	0.1	-	t	a, c
27	trans- β -Ocimene	1048	1272	0.1	0.1	0.1	0.4	0.1	t	a, c
28	γ -Terpinene	1061	1261	12.3	14.2	10.9	10.8	13.4	16.6	a, b, c
29	cis-Sabinene hydrate	1069	1567	0.3	0.4	0.4	0.5	0.2	0.3	a, c
30	cis-Linaloloxide	1072	1480	-	-	-	0.1	-	-	a, c
31	1-Nonen-3-ol	1085	1525	t	0.1	0.1	0.1	t	t	a, c
32	Terpinolene	1087	1300	0.1	0.2	0.2	0.1	t	0.3	a, b, c
33	p-Cymeneyl	1089	1452	t	t	0.1	0.1	-	0.1	a, c
34	trans-Sabinene Hydrate	1099	1482	t	t	t	0.1	t	t	a, c
35	Linalool	1104	1558	2.2	2.8	1.7	3.2	3.9	4.5	a, b, c

36	Nonanal	1106	1401	0.1	0.2	0.3	-	-	-	a, b, c
37	α -Campholenal	1125	1502	t	t	t	0.1	t	t	a, b, c
38	trans-Pinocarveol	1138	1664	t	-	-	0.1	t	-	a, c
39	trans-Verbenol	1146	1683	-	-	-	t	-	-	a, c
40	Borneol	1167	1732	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3	t	a, b, c
41	Terpinen-4-ol	1177	1613	0.4	0.3	0.2	0.4	0.1	0.1	a, b, c
42	α -Fenchyl acetate	1227	1490	t	t	0.2	t	-	-	a, c
43	Thymol methyl ether	1235	1611	-	0.1	0.1	-	-	t	a, c
44	Carvacrol methyl ether	1242	1976	0.3	0.5	-	0.1	0.1	0.1	a, c
45	Carvone	1246	1755	-	-	0.3	-	t	-	a, c
46	Thymoquinone	1252	2176	-	-	-	t	-	-	a, c
47	Thymol	1302	2212	1.7	1.7	49.3	0.6	t	0.1	a, b, c
48	Carvacrol	1318	2238	50.9	46.9	9.0	44.4	57.7	41.5	a, b, c
49	Thymyl acetate	1352	1949	-	0.4	-	0.5	-	-	a, c
50	Eugenol	1353	2372	-	-	-	-	-	0.1	a, c
51	Terpinyl acetate	1356	1714	-	-	-	-	-	0.2	a, c
52	α -Copaene	1372	1509	-	0.2	-	-	0.1	0.1	a, c
53	β -Bourbonene	1380	1536	-	-	-	0.1	0.1	0.1	a, c
54	α -Gurjunene	1403	1549	0.2	0.6	0.3	0.5	0.5	0.8	a, c
55	β -Caryophyllene	1415	1612	0.1	1.1	0.4	1.5	1.6	1.4	a, b, c
56	Aromadendrene	1437	1625	0.2	0.1	0.1	0.1	t	t	a, c
57	α -Humulene	1450	1687	-	0.1	t	0.1	0.1	0.2	a, c
58	1,6,6-Trimethylbicyclo[3.3.0] octan-3-one *	1454	1734	-	-	-	-	-	0.1	a
59	allo-Aromadendrene	1457	1663	0.1	0.2	0.1	0.2	-	0.3	a, c
60	γ -Muurolene	1472	1690	-	t	0.1	0.1	-	t	a, c
61	Germacrene D	1477	1726	-	0.7	0.2	0.5	1.0	0.7	a, c
62	Ledene	1486	1713	0.2	0.1	0.1	0.1	t	-	a, c
63	Bicyclogermacrene	1492	1766	-	0.6	0.4	0.4	0.6	0.4	a, c
64	α -Muurolene	1495	1740	-	t	t	t	t	0.1	a, c
65	β -Bisabolene	1505	1748	-	0.2	t	0.4	0.1	0.5	a, c
66	γ -Cadinene	1511	1776	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	a, c
67	δ -Cadinene	1518	1772	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	a, c
68	trans-Cadina-1-4-diene	1526	1757	-	t	-	t	-	-	a, c
69	α -Bisabolene	1537	1776	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	a, c
70	Palustrol	1558	1953	t	t	t	t	t	0.1	a, c
71	(E)-Nerolidol	1565	2050	-	-	-	-	-	0.1	a, c
72	Germacrene D-4-ol	1568	-	-	t	-	t	0.2	0.1	a, c
73	Spathulenol	1570	2154	0.5	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	a, c

74	Caryophyllene oxide	1573	2014	0.5	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2	a, b, c
75	Globulol	1574	2098	-	t	t	t	t	-	a, c
76	Viridiflorol	1587	2104	t	-	t	t	t	0.1	a, c
77	Isospathulenol	1629	2251	0.1	t	t	0.1	t	t	a, c
78	T-Cadinol	1635	2198	t	0.1	0.1	0.1	t	0.1	a, c
79	T-Muurolol	1636	-	-	t	-	t	-	t	a, c
80	β -Eudesmol	1644	2255	t	0.1	-	t	0.1	t	a, c
81	α -Cadinol	1650	2259	t	0.1	t	0.1	t	0.1	a, c
82	Linoleic acid	2148	-	t	0.1	0.1	t	-	-	a, c
Composés identifiés(%)				98.8	96.1	97.8	93.9	98.9	98.6	
Monoterpenes				40.4	37.2	32.9	38.0	31.0	45.4	
Monoterpenes oxygénés				56.1	53.3	61.3	50.4	62.3	47.1	
Sesquiterpenes				1.1	4.2	2.0	4.3	4.5	5.0	
Sesquiterpenes oxygénés				1.1	0.7	0.9	0.7	0.8	1.0	
Autres				0.1	0.7	0.7	0.5	0.3	0.1	

¹ Composés classés dans l'ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5MS ; ²Indices de rétention relatifs aux *n*-alcanes C₇-C₂₄ ; ³ TP1-TP6 : *Thymus pallescens* provenant de Sidi Aissa, Boussaâda, Oued Rhiou, Kadiria, El Asnam et Tablat respectivement ; ⁴Identification : a, Comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; b, Comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; c, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique ; t : trace (<0.1%) ; * tentative d'identification.

4.2.2.4.2. Variation de la composition en fonction des saisons et des années

Cette partie du travail s'intéressera au suivi des variations de la composition chimique de *T. pallescens* récolté de Tablat au même lieu et au même niveau à trois stades du cycle végétatif pendant quatre années successives (2003-2006). Le choix du même lieu et du même niveau est dicté par le souci de minimiser l'influence des facteurs pédoclimatiques. Les récoltes ont été effectuées au début du cycle végétatif (fin du mois de Janvier), durant la période de feuillaison (fin du mois de mars) et durant la période de floraison (3^{ème} semaine de Juin).

La variation du rendement et de la composition chimique des huiles essentielles de différents chémotypes de thym de différentes origines à travers le monde a été rapportée par plusieurs auteurs (78, 79, 98, 234). Cependant, toutes les études se rapportent aux variations saisonnières sur une année ou aux variations qui se produisent en deux ou trois ans pour une seule et même saison. Les variations saisonnières sur une seule année et même sur deux ans ne peuvent pas donner des informations statistiquement valables sur les variations de la composition chimique. L'étude qui s'étale sur plusieurs années pour une seule saison est à notre avis plus valable que la précédente approche mais reste néanmoins incomplète. Pour ces raisons nous avons préféré faire une étude qui s'étale sur quatre années (2003-2006) pour les trois stades de la vie de la plante : au début, au milieu et vers la fin du cycle végétatif.

Les résultats de l'analyse des huiles essentielles par CG et CG/SM montrent que les compositions des huiles essentielles varient durant le cycle végétatif. 72 composés au total ont été identifiés dans les huiles essentielles durant les trois stades (tableau 27). Les chromatogrammes des huiles de l'année 2005 (figures 69 et 70) illustrent quelques transformations. Dans tous les cas le **p-cymène**, le **γ -terpinène** et le **carvacrol** sont les composés les plus importants des huiles. Le carvacrol qui est le composé le plus important de chaque huile atteint son maximum **au milieu du cycle végétatif** de chaque année en s'échelonnant entre 51,1 et 65%. Le γ -terpinène évolue de **manière irrégulière** d'une année à une autre. Ce résultat est en accord avec celui rapporté pour *Thymus vulgaris* L. (235). Par contre, pour tous les ans la teneur en **p-cymène augmente** d'un stade végétatif à un autre pour atteindre son maximum (13,3-16,1%) durant la période de floraison. Les composés : 2, 4(10)-thujadien, verbenol, carvacryl acetate, β -elemène, cis-jasmonène et bicyclosésquiphellandrene, n'ont été détectés qu'au début de chaque cycle végétatif. Concernant le reste des constituants des huiles essentielles, on peut noter l'augmentation des hydrocarbures monoterpéniques au printemps (milieu du cycle végétatif) et au début de l'été (période de pleine floraison). Ce phénomène a déjà été remarqué en Italie où plusieurs plantes biosynthétisent au printemps des monoterpènes, particulièrement (235). Généralement, les sesquiterpènes et les sesquiterpènes oxygénés sont au maximum de leurs teneurs au début du cycle végétatif et diminuent durant les stades suivants. A l'exception du α -terpénole du thymol et du carvacrol, les teneurs des monoterpènes oxygénés diminuent pour atteindre leurs minimums au cours de la période de floraison.

On peut dire que les compositions chimiques des huiles essentielles de *T. pallescens* récolté de Tablat à différentes périodes du cycle végétatif pendant quatre ans montrent certaines différences qualitatives et quantitatives sans toutefois perdre leurs principales caractéristiques d'appartenance au chémotype à carvacrol et de richesse en p-cymène, γ -terpinène et carvacrol. Même si les concentrations de ces trois principaux composés varient de manière significative durant le cycle végétatif **elles finissent à chaque année par atteindre des teneurs très proches** (95b) dont les valeurs moyennes sont : 11,6, 14,2 et 49,1%, respectivement (figure 71). La période de floraison semble la plus appropriée pour la récolte et l'extraction des huiles essentielles de *T. pallescens* pour obtenir les rendements les plus élevés et une teneur appréciable en carvacrol. En outre, en cette période les huiles de toutes les années atteignent des teneurs assez proches en monoterpènes, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes et sesquiterpènes oxygénés avec des valeurs moyennes de 38,8, 53,8, 2,7 et 0,9%, respectivement (fig. 72) (95b). Ce résultat nous paraît intéressant dans la mesure où il montre une certaine stabilité de la composition de *T. pallescens* au fil des années et une stabilité relative par rapport aux régions comme nous l'avons signalé précédemment.

Tableau 27 : Composition (%) des huiles essentielles des échantillons de *T. palleescens* à trois périodes du cycle végétatif pendant quatre années successives (2003-2006)

¹ Composés	² IK		2003			2004			2005			2006			³ Identification
	HP5MS	PEG	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
α - Thujene	925	1029	0.1	0.4	2.1	0.1	1.8	2.4	2.0	2.1	2.4	0.4	0.7	2.0	a, b, c
α -Pinene	935	1026	0.4	0.5	2.8	0.1	1.4	3.0	1.6	2.0	4.3	0.4	0.7	3.6	a, b, c
2,4(10)-thujadien	945	-	t	-	-	t	-	-	t	-	-	0.1	-	-	a, c
Camphene	948	1072	0.1	t	0.2	t	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	a, b, c
Verbenene	953	1121	t	-	t	t	-	t	t	-	t	t	-	t	a, c
Sabinene	972	1132	-	-	t	t	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	a, b, c
β - Pinene	976	1119	0.1	0.1	0.5	t	0.3	0.5	0.4	0.3	0.5	0.1	0.2	0.3	a, b, c
1-Octen-3-ol	982	1411	1.0	0.2	0.3	0.7	0.3	0.2	0.5	0.2	0.2	0.6	0.2	0.2	a, c
3-Octanone	987	1225	0.3	0.1	t	0.2	0.1	t	0.2	t	t	0.2	0.1	t	a, c
β -Myrcene	992	1173	0.4	0.6	2.0	0.2	2.1	2.2	2.2	2.4	2.3	1.4	1.7	1.8	a, b, c
3-Octanol	1001	1393	0.5	0.1	0.1	0.4	0.2	0.2	0.2	t	0.1	0.3	t	t	a, c
α -Phellandrene	1005	1177	0.1	0.1	0.4	t	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.3	0.3	0.3	a, b, c
δ -3-Carene	1009	1163	t	t	0.1	t	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	a, b, c
α -Terpinene	1017	1192	0.6	0.4	2.5	0.2	2.6	3.0	3.3	2.9	2.6	2.0	2.1	2.5	a, b, c
p-Cymene	1026	1290	7.5	10.2	13.5	5.6	7.5	13.3	7.6	9.2	15.1	5.1	7.0	14.9	a, b, c
Limonene	1029	1212	t	t	t	t	0.8	0.8	0.2	0.1	1.0	0.2	0.6	0.8	a, b, c
β -Phellandrene	1029	1222	0.3	0.3	1.3	0.1	t	t	0.4	0.6	0.4	0.1	0.1	1.1	a, b, c
1-8-Cineole	1033	1223	0.1	0.1	t	0.1	t	-	0.2	0.2	-	t	t	t	a, b, c
trans- β -Ocimene	1048	1272	t	t	0.1	-	t	0.1	0.1	0.1	0.1	t	0.1	0.1	a, c
γ -Terpinene	1061	1261	6.1	6.2	10.0	8.6	15.6	12.1	15.4	15.2	11.1	15.5	17.4	13.4	a, b, c
cis-Sabinene hydrate	1069	1567	-	0.1	1.1	0.5	0.3	0.8	0.4	0.3	0.6	0.2	0.3	0.3	a, c
1-Nonen-3-ol	1085	1525	0.2	t	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	a, c

Terpinolene	1087	1300	0.1	0.1	0.1	t	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	t	t	0.1	a, b, c
p-Cymenene	1089	1452	-	-	t	-	t	t	0.1	t	t	0.1	t	t	a, c
Linalool	1099	1482	5.9	4.5	3.0	6.5	4.9	3.0	4.7	3.8	3.7	3.8	2.5	2.4	a, b, c
Nonanal	1104	1558	t	t	t	t	t	t	t	t	t	0.1	0.1	0.1	a, b, c
Campholene aldehyde	1106	1401	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	a, b, c
trans-Sabinene hydrate	1099	1482	t	t	t	t	t	t	-	-	-	-	-	-	a, c
trans-Pinocarveol	1138	1664	0.1	t	t	0.2	t	t	0.1	t	t	0.1	t	t	a, c
Verbenol	1146	1683	t	-	-	t	-	-	t	-	-	t	-	-	a, c
Borneol	1167	1732	0.4	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	t	t	a, b, c
4 - Terpineol	1177	1613	0.4	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1	a, b, c
α -Terpineol	1194	1723	-	-	0.1	-	-	0.1	-	-	0.1	-	-	t	a, b, c
thymol methyl ether	1235	1611	0.3	t	-	0.2	0.1	t	0.2	t	-	0.2	0.1	-	a, c
Carvacrol methyl ether	1242	1976	1.9	0.2	0.1	1.1	0.6	0.3	0.5	0.2	0.2	1.1	0.3	t	a, c
Thymol	1302	2212	0.6	0.2	0.2	0.6	0.8	0.8	0.4	0.2	0.5	0.3	0.1	0.1	a, b, c
Carvacrol	1318	2238	56.2	65.0	52.5	43.9	51.1	47.3	39.7	52.9	47.1	45.8	56.9	49.7	a, b, c
Eugenol	1353	2172	0.1	0.4	-	0.1	-	-	0.1	-	t	-	-	-	a, b, c
α -Copaene	1372	1509	0.1	t	t	0.1	0.1	0.1	t	t	t	0.1	t	t	a, c
Carvacryl acetate	1379	-	t	-	-	0.1	-	-	t	-	-	0.1	-	-	a, c
β -Bourbonene	1380	1536	t	t	t	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	t	t	a, c
β -Elemene	1389	1600	t	-	-	0.1	-	-	t	-	-	t	-	-	a, c
cis-Jasmone	1402	1972	t	-	-	0.1	-	-	t	-	-	t	-	-	a, c
α -Gurjunene	1403	1549	1.2	0.6	0.3	0.8	0.7	0.4	1.1	0.8	0.6	1.2	0.7	0.4	a, c
β -Caryophyllene	1415	1612	1.7	0.8	0.9	1.9	1.5	1.3	2.4	0.6	0.8	2.1	1.5	0.6	a, b, c
β -Gurjunene	1426	1532	t	t	-	0.1	t	-	t	-	t	0.1	t	t	a, c
Aromadendrene	1437	1625	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	t	0.2	t	t	a, c

α -Humulene	1450	1687	0.1	t	t	0.1	0.1	t	0.2	-	-	0.1	0.1	t	a, c
allo-Aromadendrene	1457	1663	0.4	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1	a, c
γ -Muurolene	1472	1690	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	t	0.1	0.1	t	t	a, b, c
Germacrene D	1477	1726	0.2	0.1	0.1	0.6	0.6	0.4	1.2	0.7	0.3	0.9	0.9	0.4	a, c
Bicyclosiquiphellandrene	1485	1755	t	-	-	0.1	-	-	t	-	-	t	-	-	a, c
Ledene	1486	1713	0.4	0.2	0.1	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.2	t	t	a, c
Bicyclogermacrene	1492	1766	-	-	-	0.1	-	-	1.1	0.5	0.3	1.0	0.9	0.4	a, c
α -Muurolene	1495	1740	0.1	0.1	t	0.2	t	-	0.1	t	t	0.1	t	t	a, c
β -Bisabolene	1505	1748	0.6	0.5	0.1	0.4	0.2	t	0.8	0.1	0.1	0.8	0.3	0.1	a, c
γ -Cadinene	1511	1776	0.2	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	a, c
δ -Cadinene	1518	1772	0.6	0.3	0.2	1.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.1	0.5	0.1	0.1	a, c
Cadina- 1,4 -diene	1526	1757	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	a, c
α -Calacorene	1535	1941	t	t	t	-	-	-	-	-	-	t	t	t	a, c
α - Bisabolene	1535	1776	0.2	t	t	0.2	0.1	0.1	t	-	t	0.2	t	-	a, c
Elemol	1549	2081	t	t	t	4.6	t	t	t	t	t	-	-	-	a, c
Palustrol	1558	1953	0.1	t	t	0.2	0.1	0.1	0.1	t	t	0.1	t	t	a, c
Germacrene D-4-ol	1568	-	0.4	0.1	0.1	0.5	0.1	0.1	0.6	0.2	0.1	0.5	0.3	0.1	a, c
Spathulenol	1570	2154	0.6	0.5	0.4	2.0	0.4	0.4	0.3	0.2	0.4	0.6	0.2	0.2	a, b, c
Caryophyllene oxide	1573	2014	0.5	1.3	0.4	0.2	0.2	0.2	0.4	0.1	0.3	0.7	0.1	0.1	a, b, c
Viridiflorol	1587	2104	0.2	0.2	t	0.7	0.1	0.1	0.2	t	t	0.2	0.1	t	a, c
Isospathulenol	1629	2251	0.1	0.1	t	t	t	-	0.1	t	t	t	t	t	a, c

t-Cadinol	1635	2198	0.2	0.1	0.1	1.3	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	0.1	t	a, c
β -Eudesmol	1644	2255	0.1	t	t	3.0	0.1	t	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	t	a, c
α -Cadinol	1650	2259	0.2	0.1	0.1	2.5	0.1	0.1	0.3	0.1	t	0.3	0.1	t	a, c
Phytol	2121		0.1	t	t	0.2	0.1	0.1	0.1	t	-	0.1	0.1	t	a, c
Composés identifiés (%)			92.5	95.6	96.7	92.3	97.2	95.8	92.7	97.9	97.6	90.8	97.9	96.9	

¹ Composés classés dans l'ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5MS ; ²Indices de rétention relatifs aux *n*-alcane C₇-C₂₄ ; ³Identification : a, Comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; b, Comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; c, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique ; t : trace (<0.1%) ; A, B et C : début, milieu et fin du cycle végétatif.

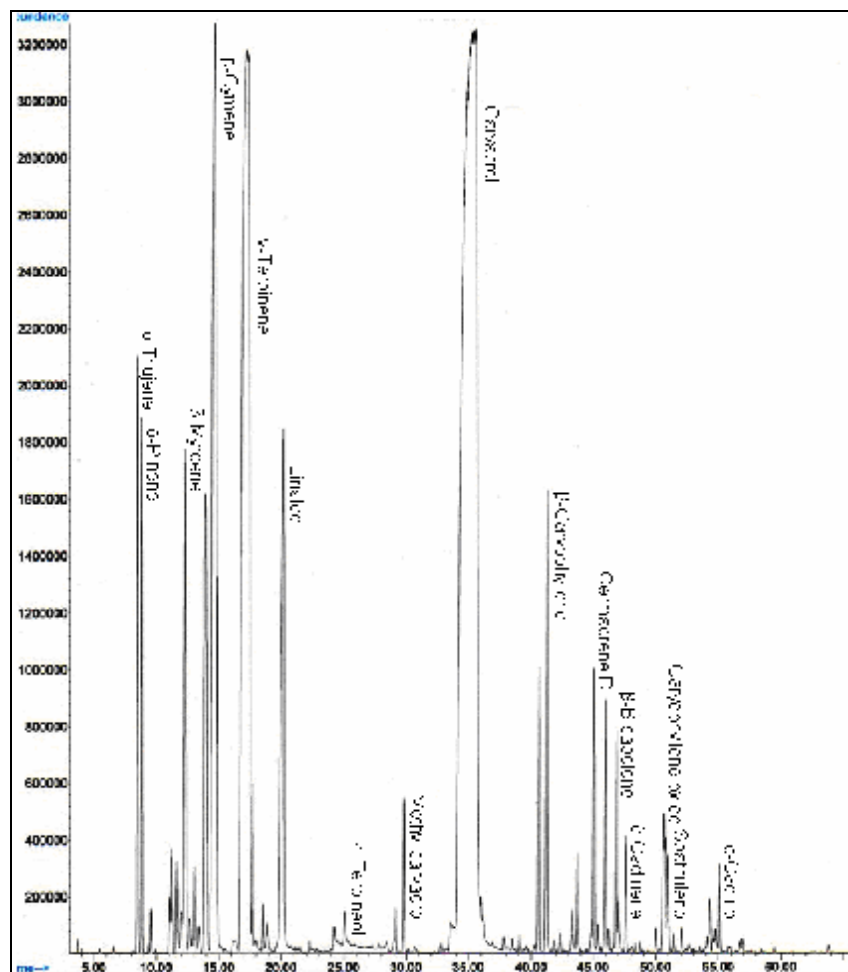


Figure 69 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. pallescens* de Tablat au début du cycle végétatif (récolte de 2005)

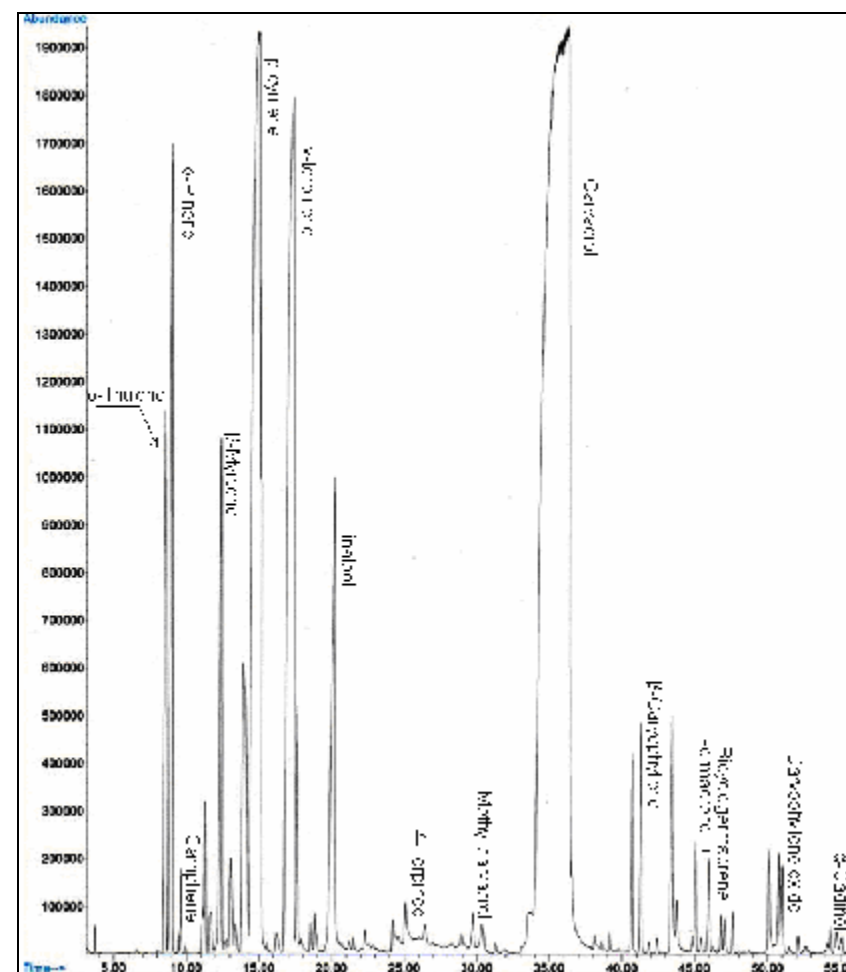


Figure 70 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. pallescens* de Tablat en période de floraison (récolte de 2005)

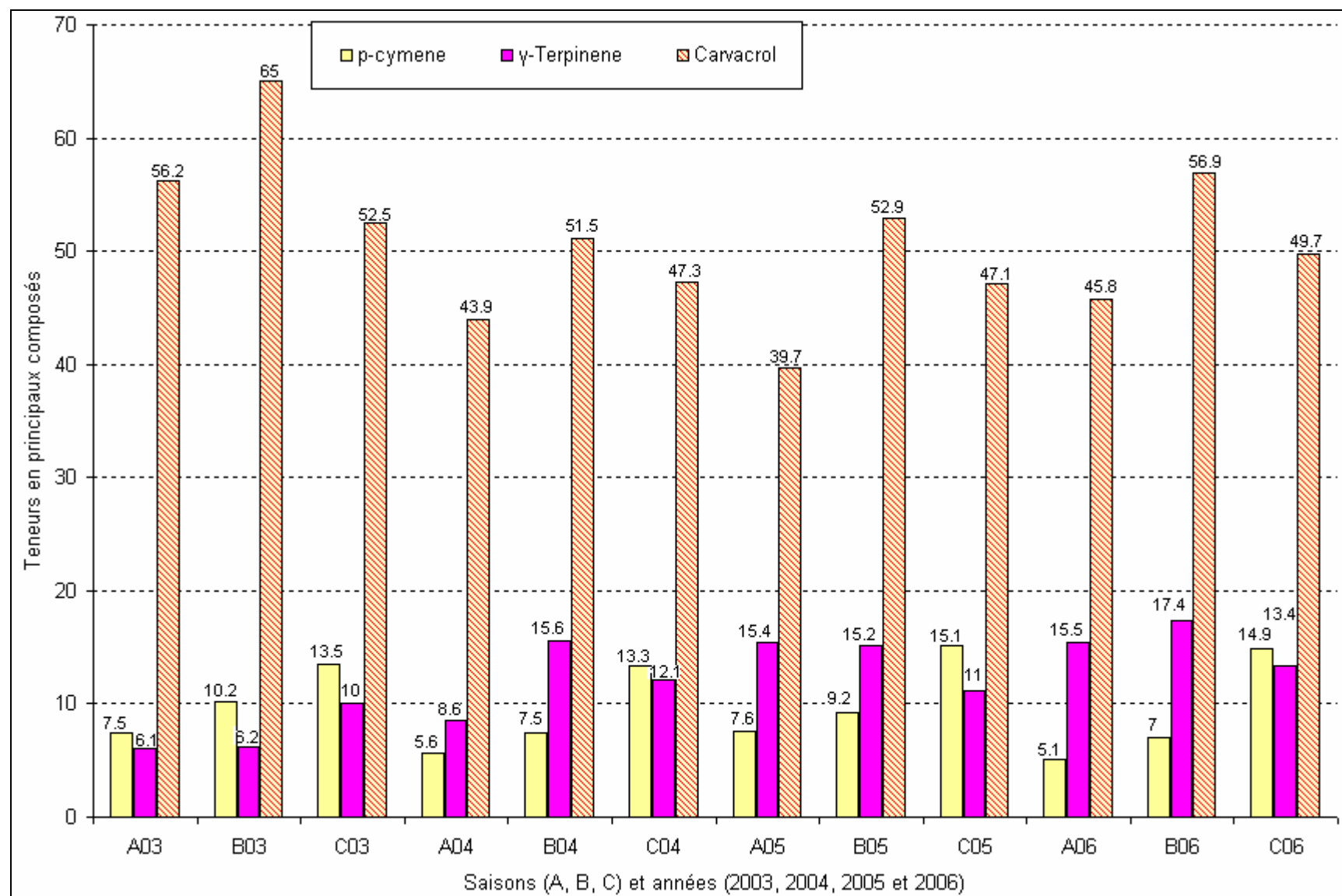


Figure 71: Variation des teneurs des principaux composés (p-cymene, γ -terpinene et carvacrol) de l'huile essentielle de *Thymus Pallescens* en fonction des saisons (A : début B : milieu, C : fin du cycle végétatif) et des années (2003-2006)

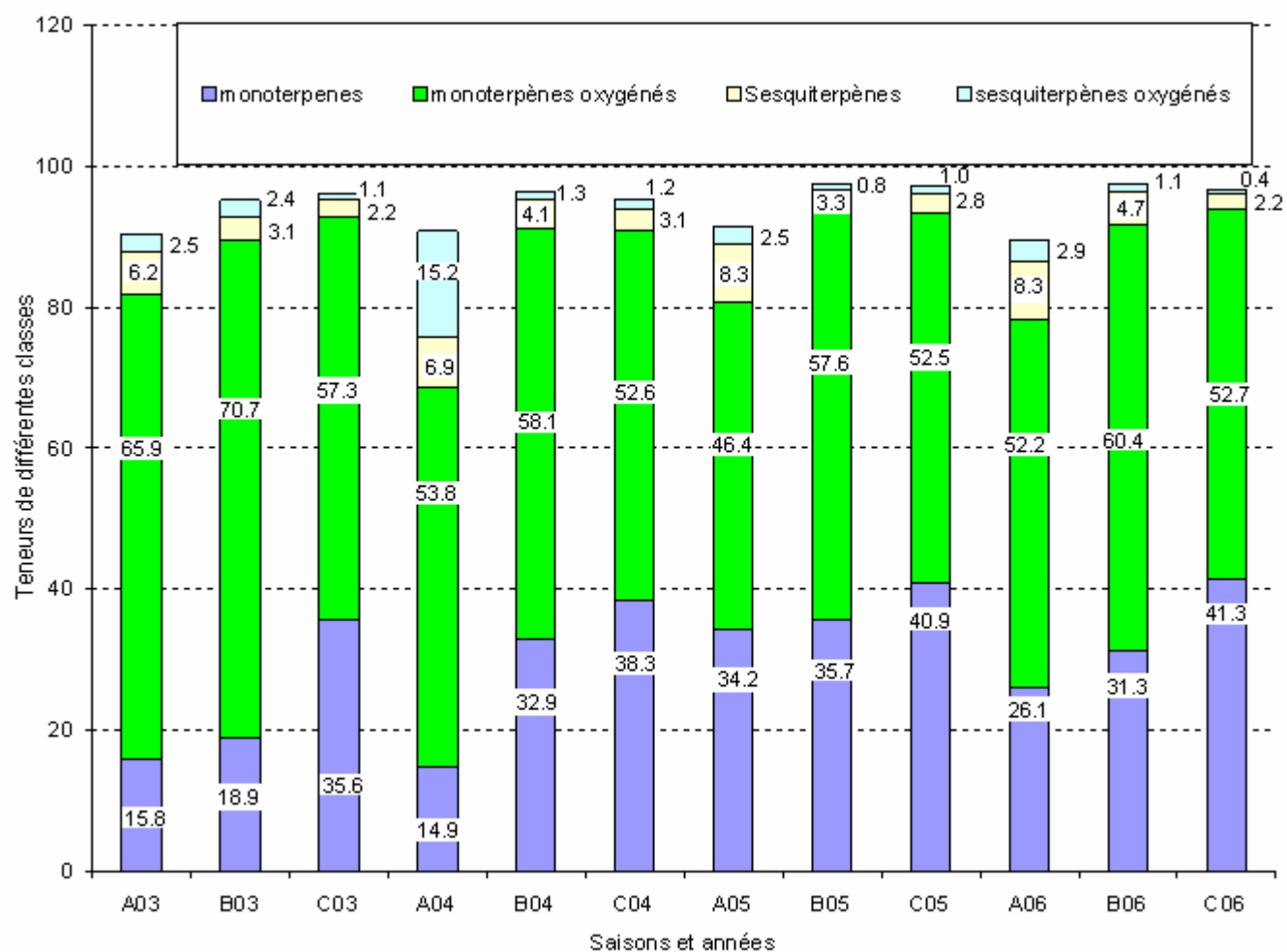


Figure 72 : Variation des teneurs en monoterpènes, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes et sesquiterpènes oxygénés de l'huile essentielle de *Thymus Pallescens* en fonction des saisons (A : début, B : milieu, C : fin du cycle végétatif) et des années (2003-2006)

4.2.2.4.3. Compositions des huiles essentielles issues des feuilles et des fleurs

L'analyse par CG et CG/MS des huiles essentielles extraites des feuilles et des fleurs a permis l'identification de 72 composés représentant 96.9% de l'huile des feuilles et 70 composés totalisant 98.1% de l'huile essentielle des fleurs (tableau 28). Les hydrocarbures monoterpéniques et les monoterpènes oxygénés représentent la quasi-totalité des huiles des feuilles et des fleurs avec des taux de 89,9% pour les feuilles et 94,2% pour les fleurs. Les principaux composés des feuilles et des fleurs sont α -pinene (6,2% et 4,9%), p-cymene (17,4% et 9,2%), γ -terpinene (10,6% et 14,1%) linalool (5,0% and 3,1%) et carvacrol (34,0% et 48,3%), respectivement. Les constituants des huiles des deux parties de la plante sont les mêmes à l'exception de trois composés (3-hexen-1-ol, thymoquinone et thymyl acetate) qui ont été détectés uniquement dans les feuilles à l'état de traces. Ces huiles ne diffèrent que par les teneurs de leurs constituants comme cela a été le cas pour celles issues des feuilles et des fleurs d'*Origanum floribundum* et étudiées précédemment.

La comparaison des deux huiles relatives aux feuilles et aux fleurs montre que celle des feuilles contient des quantités supérieures de α -pinene (6,2% vs. 4,9%), p-cymene (17,4% vs. 9,4%), limonene (1,2 vs. 0,1%), linalool (5,0 vs.3,1%), spathulenol (0,6 vs. 0,2%) et caryophyllene oxide (0,7% vs. 0,2%). Par contre, l'huile essentielle des fleurs contient des concentrations plus grandes de myrcene (3,5% vs. 2,4%), α -terpinene (2,8% vs. 1,3%), β -phellandrene (1,5% vs. 0,2%), γ - terpinene (14,1% vs.10,6%), thymol (1,8% vs. 0,3%) et carvacrol (48,3% vs. 39,0%).

Les trois principaux composés des feuilles et des fleurs sont le p-cymene, le γ -terpinene et le carvacrol. Le premier composé se trouve concentré essentiellement dans les feuilles tandis que les deux autres sont plus importants dans les fleurs. Les sesquiterpènes et les sesquiterpènes oxygénés sont concentrés principalement dans les feuilles tandis que les monoterpènes oxygénés sont plus importants dans les fleurs. Cette prépondérance des monoterpènes oxygénés est due essentiellement à l'importance relative du carvacrol dans les fleurs.

Tableau 28 : Composition (%) des huiles essentielles de *Thymus palleescens* de Kadiria extraites à partir des feuilles et des fleurs

N°	Composés	IK		<i>T. palleescens</i>	
		HP 5MS	PEG	Feuilles	Fleurs
1	Ethyl n-valerate	847		t	t
2	(E)-2-Hexanal	850	1090	t	t
3	3-Hexen-1-ol	857		t	-
4	3-Heptanone	886		t	t
5	Tricyclene	923	1017	t	t
6	α -Thujene	925	1029	1.8	2.3
7	α -Pinene	935	1026	6.2	4.9
8	2,4(10)-Thujadiene	945	-	0.1	t
9	Camphene	948	1072	0.2	0.1
10	Verbenene	953	1121	0.1	t

11	Sabinene	972	1132	0.1	0.2
12	β -Pinene	976	1119	0.6	0.4
13	1-Octen-3-ol	982	1411	0.3	0.2
14	3-Octanone	987	1225	0.1	t
15	Myrcene	992	1173	2.4	3.5
16	3-octanol	1001	1393	0.1	0.1
17	α -phellandrene	1005	1177	0.3	0.5
18	δ -3-Carene	1009	1163	0.1	0.1
19	α -Terpinene	1017	1192	1.3	2.8
20	p-Cymene	1026	1290	17.4	9.2
21	Limonene	1029	1212	1.2	0.1
22	β -Phellandrene	1030	1222	0.2	1.5
23	1,8-cineole	1033	1223	0.2	0.1
24	(Z)- β -ocimene	1039	1246	t	t
25	(E)- β -Ocimene	1048	1272	0.2	0.1
26	γ -Terpinene	1061	1261	10.6	14.1
27	cis-Sabinene hydrate	1069	1567	0.7	0.4
28	1-Nonen-3-ol	1085	1525	0.1	t
29	Terpinolene	1087	1300	0.1	0.2
30	p-Cymenyl	1089	1452	t	t
31	trans-Sabinene hydrate	1099	1482	t	t
32	Linalool	1104	1558	5.0	3.1
33	Campholaldehyde	1125	1502	0.1	t
34	trans-Pinocarveol	1138	1664	0.2	t
35	Verbenol	1146	1683	0.2	t
36	Borneol	1167	1732	0.4	0.2
37	Terpinen-4-ol	1177	1613	0.3	0.3
38	α -Terpineol	1194	1723	0.1	t
39	cis-Dihydrocarvone	1197	1626	0.2	t
40	trans-Dihydrocarvone	1203	1647	0.2	t
41	Methyl thymol	1235	1611	t	t
42	Methyl carvacrol	1242	1976	0.2	0.1
43	Thymoquinone	1257	-	0.1	-
44	Thymol	1302	2212	0.3	1.8
45	Carvacrol	1318	2238	39.0	48.3

46	Thymyl acetate	1352	1949	t	-
47	α -Copaene	1372	1509	t	t
48	β -Courbonene	1380	1356	0.1	t
49	α -Gurjunene	1403	1549	0.5	0.2
50	β -Caryophyllene	1415	1612	1.5	1.2
51	β -Gurjunene	1426	1532	0.1	t
52	Aromadendrene	1437	1625	0.1	0.1
23	α -Humulene	1450	1687	0.1	0.1
54	allo-Aromadendrene	1457	1663	0.2	0.1
55	γ -Muuroolene	1472	1690	0.1	t
56	Germacrene D	1477	1726	0.5	0.5
57	Ledene	1486	1713	0.1	t
58	Bicyclogermacrene	1492	1766	0.5	0.5
59	α -Muuroolene	1495	1740	t	t
60	β -Bisabolene	1505	1748	0.4	0.1
61	γ -Cadinene	1511	1776	0.1	0.1
62	δ -Cadinene	1518	1772	0.1	0.1
63	Cadina-1,4-diene	1526	1757	t	t
64	Palustrol	1558	1953	t	t
65	Germacrene D-4-ol	1568	-	0.1	t
66	Spathulenol	1570	2154	0.6	0.2
67	Caryophyllene oxide	1573	2014	0.7	0.2
68	Viridiflorol	1580	2057	0.1	t
69	Isospathulenol	1629	2251	t	t
70	t-Cadinol	1635	2198	0.1	t
71	β -Eudesmol	1644	2255	0.1	t
72	α -Cadinol	1650	2259	0.1	0.1
	Composés identifiés (%)			96.9	98.1
	Monoterpènes			42.9	40.0
	Monoterpènes oxygénés			47.0	54.2
	Sesquiterpenes			4.4	3.0
	Sesquiterpenes oxygénés			1.8	0.5
	Autres			0.8	0.4

t = trace (<0.1%)

4.2.2.4.4. Effet du mode de séchage sur la composition de l'huile

Il est bien connu qu'une huile extraite à partir d'une matière végétale fraîche est toujours plus ou moins différente de celle obtenue à partir de la matière séchée. Dans quel sens influera le mode de séchage sur la composition de l'huile essentielle de *Thymus pallescens* ? Dans le but d'essayer de répondre à cette question, nous étudierons dans cette partie l'influence du séchage à la température ambiante du laboratoire (25-28°C) durant 4 jours et du séchage à froid à 6°C pendant une semaine. Dans ce type de travail si on utilise la plante récoltée en période de floraison il faut prendre un certain nombre de précautions. En effet, nous avons vu précédemment que les feuilles et les fleurs avaient des compositions quantitatives plus ou moins différentes et par conséquent il est plus prudent d'utiliser pour les extractions et pour chaque mode de séchage les mêmes quantités des deux parties de la plante pour une comparaison plus rigoureuse. L'examen des résultats de l'analyse par CG et CG/ MS de l'échantillon provenant de Tablat (récolte de 2005) montre qu'il n'y a pas de différences quantitatives significatives entre les compositions des huiles résultant des deux modes de séchage (tableau 29). Ce résultat est en accord avec celui rapporté par d'autres auteurs (236) pour *Thymus vulgaris* L. séché à l'air à 30°C et avec un courant d'air froid (tableau 30). Cependant, ces auteurs rapportent des valeurs légèrement supérieures pour le séchage à 30°C par rapport au séchage à froid par contre nous avons trouvé une tendance contraire à leur résultat pour les monoterpènes et une tendance en accord avec leur résultat pour les sesquiterpènes.

Tableau 29 : Effet du mode de séchage sur la composition des huiles essentielles de *Thymus pallescens* de Tablat

N°	Composés	Séchage à température ambiante	Séchage à froid
1	(E)-2-Hexenal	-	t
2	1-Hexanol	-	t
3	3-Heptnone	t	t
4	Tricyclene	t	t
5	α - Thujene	2.4	2.7
6	α -Pinene	5.4	5.7
7	2,4(10)-thujadien	t	t
8	Camphene	0.1	0.2
9	Verbenene	t	t
10	Sabinene	0.1	0.2
11	β - Pinene	0.6	0.7
12	1-Octen-3-ol	0.1	0.1
13	3-Octanone	t	t
14	β -Myrcene	2.3	2.6
15	3-Octanol	t	t
16	α -Phellandrene	0.3	0.4
17	δ -3-Carene	0.1	0.1
18	α -Terpinene	2.6	3.0
19	p-Cymene	11.9	12.2

20	Limonene	0.1	0.1
21	β -Phellandrene	0.9	1.0
22	1-8-Cineole	0.1	0.1
23	cis- β -Ocimene	t	t
24	trans- β -Ocimene	0.1	0.1
25	γ -Terpinene	13.9	14.7
26	cis-Sabinene hydrate	0.2	0.5
27	1-Nonen-3-ol	t	t
28	Terpinolene	0.1	0.1
29	p-Cymenyl	t	t
30	trans-Sabinene hydrate	t	t
31	Linalool	3.1	3.3
32	Nonanal	t	t
33	Campholene aldehyde	-	t
34	trans-Pinocarveol	t	0.1
35	Verbenol	t	t
36	Borneol	0.2	0.2
37	4 - Terpeneol	0.2	0.2
38	α -Terpineol	t	t
39	Carvcrol methyl ether	t	t
40	Thymoquinone	t	t
41	Thymol	0.9	0.7
42	Carvacrol	46.9	47.5
43	β -Bourbonene	t	t
44	α -Gurjunene	0.6	0.5
45	β -Caryophyllene	1.0	0.7
46	β -Gurjunene	t	t
47	Aromadendrene	0.1	t
48	α -Humulene	t	t
49	Allo-Aromadendrene	0.1	0.1
50	γ -Muurolene	t	t
51	Germacrene D	0.3	0.2
52	Ledene	t	t
53	Bicyclogermacrene	0.4	0.3
54	α -Muurolene	t	t
55	β -Bisabolene	t	t
56	γ -Cadinene	0.1	t
57	δ -Cadinene	0.1	0.1
58	Cadina- 1,4 -Diene	t	t
59	α - Bisabolene	t	t

60	Palustrol	t	t
61	Germacrene D-4-ol	-	t
62	Spathulenol	0.3	0.2
63	Caryophyllene oxide	0.3	0.2
64	Viridiflorol	t	t
65	Ledol	t	t
66	Isospathulenol	t	t
67	T-Cadinol	0.1	t
68	β -Eudesmol	t	t
69	α -Cadinol	t	t

t= traces (<0.1%)

Tableau 30 : teneur en mg/Kg des principaux composés de *Thymus vulgaris* L. séché à l'air chaud (30°C) et à froid (236)

Composés	Séchage à température ambiante	Séchage à froid
Myrcene	314	285
α -Terpinene	226	215
γ -Terpinene	1298	1293
Thymol	6917	6907
β -Caryophyllene	288	282

4.2.2.4.5. Variation de la composition de l'huile essentielle au cours de l'extraction

Dans le but de déterminer la variation de la composition au cours de l'extraction (Hydrodistillation) de l'huile essentielle de *T. pallescens* (Kadiria) nous avons recueilli les fractions obtenues après 5, 15, 30, 45 et 75 minutes. Une autre fraction a été recueillie après 120 minutes. Cette fraction a été recueillie avec de l'éther diéthylique étant donné sa faible quantité. Durant la période d'attente pour son analyse elle s'est desséchée pour cause de mauvaise étanchéité du bouchon du flacon et n'a pu donc être analysée. L'échantillon utilisé est celui provenant de Kadiria.

La composition chimique des différentes fractions (tableau 31) montre des variations qualitatives et quantitatives entre les fractions. On remarque une diminution des quantités d'huiles recueillies au cours du temps bien qu'on a omis de noter les quantités exactes recueillies pour chaque fraction.

Les concentrations de tous les hydrocarbures monoterpéniques et les monoterpènes oxygénés diminuent au cours du temps à l'exception du carvacrol. Mais l'augmentation de la concentration du carvacrol (figure 73) n'est que relative et indique que ce composé continue à distiller avec un rendement inférieur au rendement qui le précède mais avec une importance plus grande par rapport aux autres composés dans le volume recueilli au temps considéré.

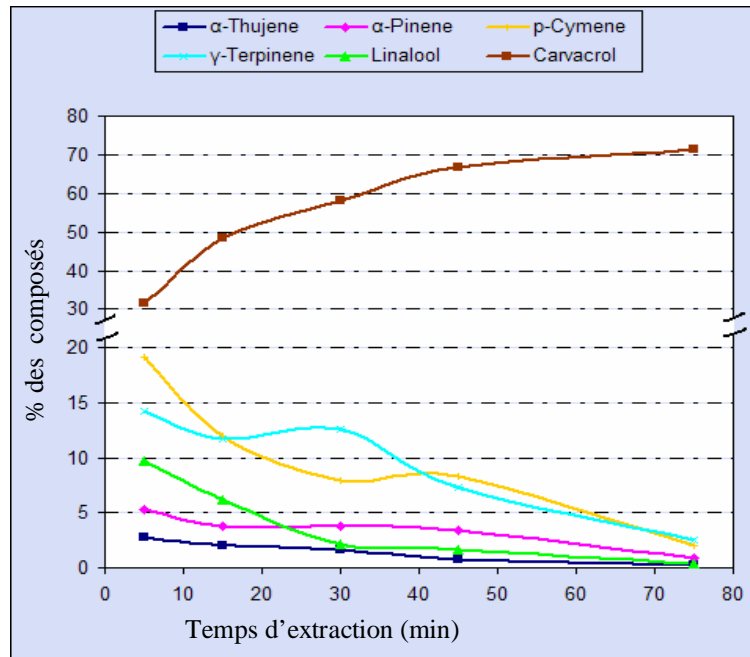


Figure 73 : Evolution de la concentration de quelques composés majoritaires de *Thymus pallescens* de Kadiria au cours de l'extraction dans les fractions d'huiles récupérées

Tableau 31 : Compositions chimiques (%) des différentes fractions de *Thymus pallescens* de Kadiria au cours de l'extraction

N°	Composés	Fractions d'huiles essentielles				
		5 min	15 min	30 min	45 min	75 min
1	Ethyl n-valerate	t	-	-	-	-
2	3-Heptanone	t	-	-	-	-
3	Tricyclene	t	t	t	t	-
4	α -Thujene	2.7	2.0	1.6	0.8	0.2
5	α -Pinene	5.2	3.7	3.7	3.4	0.9
6	2,4(10)-Thujadien	t	t	t	t	t
7	Camphene	0.2	0.2	0.2	0.1	t
8	Verbenene	t	t	t	t	t
9	Sabinene	t	0.1	0.1	t	t
10	β -Pinene	1.4	1.0	0.9	0.9	0.1
11	1-Octen-3-ol	0.5	0.2	0.1	-	-
12	3-Octanone	t	t	t	-	-
13	β -Myrcene	3.1	2.3	2.1	0.9	0.3
14	3-Octanol	0.2	0.1	t	-	-
15	α -Phellandrene	0.4	0.3	0.3	0.1	t
16	δ -3-Carene	0.1	0.1	0.1	t	t
17	α -Terpinene	2.8	2.3	2.0	1.1	0.3
18	p-Cymene	19.1	12.0	7.9	8.2	2.0
19	Limonene	1.0	2.0	0.7	0.1	0.1

20	β -Phellandrene	0.2	0.2	0.2	0.6	0.1
21	Eucalyptol	0.8	0.4	0.2	0.1	t
22	(Z)- β -Ocimene	t	t	t	-	-
23	(E)- β -Ocimene	0.2	0.2	0.2	t	t
24	γ -Terpinene	14.3	11.7	12.6	7.3	2.5
25	cis-Sabinene hydrate	1.1	0.7	0.2	0.1	t
26	cis-Linalool oxide	t	0.1	-	-	-
27	1-Nonen-3-ol	t	t	-	-	-
28	Terpinolene	0.1	0.1	0.1	t	t
29	p-Cymenyl	t	0.1	-	-	-
30	trans-Sabinene hydrate	t	t	t	t	-
31	Linalool	9.8	6.1	2.1	1.6	0.4
32	Campholene aldehyde	0.1	t	t	-	-
33	Pinocarveol	0.1	0.1	t	t	-
34	Camphor	t	t	-	-	-
35	Verbenol	t	t	-	-	-
36	Pinocarvone	t	-	-	-	-
37	Borneol	0.4	0.6	0.2	0.1	-
38	4-Terpineol	0.2	0.5	0.1	0.2	0.1
39	α -Terpineol	t	t	t	-	-
40	Thymol methyl ether	t	0.1	0.1	t	t
41	Carvacrol methyl ether	0.7	0.8	0.8	0.4	0.3
42	Thymoquinone	t	-	-	-	-
43	Thymol	0.3	0.8	0.8	1.0	0.7
44	Carvacrol	31.5	48.5	58.3	66.8	71.6
45	Thymyl acetate	0.3	0.3	0.1	-	-
46	β -Bourbonene	t	t	t	t	0.1
47	α -Gurjunene	0.2	0.1	0.3	0.3	0.7
48	β -Caryophyllene	0.4	0.4	0.9	1.0	2.1
49	β -Gurjunene	t	-	-	-	-
50	Aromadendrene	t	t	t	0.1	0.3
51	α -Humulene	t	t	t	t	0.1
52	allo-aromadendrene	-	t	-	0.1	0.7
53	γ -Muurolene		t	-	0.1	0.4
54	Germacrene D	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2
55	Ledene	-	t	t	t	0.1
56	Bicyclogermacrene	0.1	0.1	0.2	-	-
57	α -Muurolene	t	t	t	t	0.1
58	β -Bisabolene	0.1	0.1	0.2	0.3	0.8
59	γ -Cadinene	t	t	0.1	0.2	0.4

60	δ -Cadinene	t	0.1	0.1	0.2	0.7
61	Cadina-1,4-diene	-	-	-	t	0.1
62	α -Calacorene	-	-	-	-	0.1
63	α -Bisabolene	t	t	0.1	0.1	0.3
64	Palustrol	-	t	0.1	0.1	0.1
65	Germacrene D-4-ol	t	t	t	-	-
66	Spathulenol	0.1	0.2	0.5	0.3	1.0
67	Caryophyllene oxide	0.1	0.2	0.5	0.6	1.4
68	Globulol	-	-	t	t	-
69	Viridiflorol	-	-	-	t	0.1
70	Ledol	-	-	t	t	0.2
71	Isospathulenol	-	t	t	t	0.1
72	t-Cadinol	-	t	0.1	0.4	0.6
73	β -Eudesmol	-	t	t	0.1	0.3
74	α -Cadinol	-	-	-	0.1	0.1
75	Hexadecanoic acid	-	-	-	-	0.1
76	Phytol	-	-	-	-	t
	Total %	97.9	98.9	98.7	97.8	90.9

t : traces (<0.1%)

4.2.2.4.6. Composition des fractions issues de la distillation fractionnée

Cette partie vise en premier lieu le fractionnement en deux parties de l'huile essentielle de *T. palleescens* de Boussaâda par distillation fractionnée sous vide sur une colonne Vigreux afin d'obtenir une fraction riche en monoterpènes et une autre plus riche en monoterpènes oxygénés et plus particulièrement du carvacrol. Le but principal est le test de l'efficacité de chacune des fractions en tant qu'antioxydant par rapport à la totalité de l'huile. Les deux fractions ont été récupérées après avoir atteint une température constante en tête de colonne et une fin d'apparition de gouttes de distillat.

L'analyse des deux fractions par CG et CG/MS (tableau 32) montre que la première fraction est très riche en hydrocarbures monoterpéniques par rapport à la deuxième tandis que cette dernière est plus riche en monoterpènes oxygénés (82.1%) constitués en très grande majorité par du carvacrol qui représente **81.4%**. Bien qu'elle soit riche en hydrocarbures monoterpéniques (52.0%), la première fraction contient néanmoins une quantité appréciable de monoterpènes oxygénés (44.6%) dont **43.1%** sont constitués avec du carvacrol. Donc, nous avons finalement obtenu une fraction très riche en carvacrol et en sesquiterpènes (3.0%) et pauvre en hydrocarbures monoterpéniques et une autre fraction riche en hydrocarbures monoterpéniques et en carvacrol mais qui ne contient que 0.3% de sesquiterpènes et aucun sesquiterpène oxygéné. Ces deux compositions paraissent a priori logiques étant donné que la première fraction contient plus de composés les plus volatils (monoterpènes) et moins de composés lourds (sesquiterpènes) et inversement pour la seconde fraction.

Tableau 32 : Composition (%) des deux fractions *T. palleescens* de Boussaada issues de la distillation

N °	Composés	Fraction 1	Fraction 2
1	α -Thujene	4.0	0.1
2	α -Pinene	2.9	0.1
3	Camphene	0.2	t
4	Sabinene	0.2	t
5	β -Pinene	0.5	t
6	1-Octen-3-Ol	-	0.1
7	3-Octanone	-	t
8	β -Myrcene	2.6	0.2
9	3-Octanol	-	t
10	α -Phellandrene	0.4	0.1
11	δ -3-Carene	t	t
12	α -Terpinene	3.9	0.6
13	p-Cymene	10.5	4.7
14	β -Phellandrene	-	0.2
15	Limonene	1.3	-
16	trans- β -Ocimene	-	t
17	γ -Terpinene	25.3	5.4
18	cis-Sabinene hydrate	-	0.1
19	trans- β -Ocimene	0.2	-
20	1-Nonen -3-Ol	-	t
21	Terpinolene	t	0.1
22	p-Cymenyl	-	t
23	Linalool	1.5	-
24	Campholene aldehyde	-	t
25	Borneol	-	0.1
26	4-Terpineol	t	0.1
27	α -Terpineol	-	t
28	Thymol methylether	t	0.3
29	Thymol	t	0.1
31	Carvacrol	43.1	81.4
31	α -Copaene	-	0.1
32	α -Gurjunene	0.1	0.4
33	β -Caryophyllene	0.2	0.7
34	Aromadendrene	-	0.1
35	α -Humulene	-	0.1
36	Germacrene D	-	0.1

37	Ledene	-	0.1
38	α -Muurolene	-	t
39	β -Bisabolene	-	0.1
40	γ -Cadinene	-	0.1
41	δ -Cadinene	-	0.2
42	cis- α -Bisabolene	-	0.1
43	Spathulenol	-	0.4
44	Caryophyllene oxide	-	0.2
45	t-Cadinol	-	0.1
46	β -Eudesmol	-	0.1
47	α -Cadinol	-	0.1
48	Total	96.9	96.7
	Monoterpenes	52.0	11.5
	Monoterpenes oxygénés	44.6	82.1
	Sesquiterpenes	0.3	2.1
	Sesquiterpenes oxygénés	0.0	0.9
	Autres	0.0	0.1

4.2.2.4.7. Effet de l'exposition à la lumière sur la composition

Cette huile a été exposée de manière continue pendant une période de plus de trois mois au chauffage dans une étuve réglée à 40°C. Parallèlement, une autre fraction de cette huile a été exposée pour la même période à la lumière pour des durées alternées de 16 heures de lumière et de huit heures d'obscurité par 24 heures. La lumière s'allume et s'éteint automatiquement après les durées de lumière et d'obscurité citées. L'huile était dans des flacons transparents bien fermés. Des prélèvements d'huile sont effectués après une certaine durée d'exposition à la lumière et à la chaleur et sont analysés pour déterminer leur composition chimique et leur activité antioxydante. Les échantillons soumis à l'effet de la chaleur sont en attente de leur analyse tandis que ceux soumis à la lumière sont dans une phase avancée d'analyse. Nous exposerons ici les résultats partiels de l'analyse chimique de l'échantillon exposé à la lumière.

L'analyse de la composition chimique montre qu'il y a des changements des teneurs pour certains constituants de l'huile durant le stockage de cette dernière en exposition à la lumière (tableau 33). Ces changements sont parfois très significatifs et ils varient d'un composé à un autre et il est possible de diviser les composés en groupes. Un groupe pour lequel il n'y a eu aucun changement, un groupe pour lequel il y a eu un léger changement et un autre où il y a eu une variation importante. Les composés appartenant au groupe où il n'y a pas de variation sont les suivants : camphene, 1-octen-3-ol, 3-octanol, δ -3-carene, β -ocimene, β -phellandrene, terpinolene, borneol, methyl carvacrol et la quasi-totalité des sesquiterpènes. Le groupe comprenant les composés à faible variation contient le β -pinene, le cis et le trans- sabinene, le β -caryophyllene et le spathulenol, tandis que le reste des composés appartient au groupe dont la variation a été importante. On peut remarquer aussi qu'à partir du 18^{ème} jour de stockage la composition devient relativement stable tant au niveau de la teneur des constituants que celle des différentes classes de composés (tableau 34). Ainsi, on remarque très peu de différences entre les échantillons du 18^{ème} et celui du 40^{ème} jour d'exposition à la lumière.

Tableau 33 : Composition (%) de l'huile essentielle de *T. pallescens* de Boussaâda exposée à la lumière

N°	Composés	Huile de référence	Après 4 jours	Après 18 jours	Après 40 jours
1	Tricyclene	t	t	t	t
2	α -Thujene	2.0	2.3	0.8	1.0
3	α -Pinene	1.6	1.9	0.6	0.8
4	2,4(10)-Thujdiene	t	t	t	t
5	Camphene	0.1	0.1	0.1	0.1
6	Sabinene	t	t	t	t
7	β -Pinene	0.3	0.3	0.2	0.2
8	1-Octen-3-ol	0.1	0.2	0.2	0.2
9	3-Octanone	t	t	0.1	0.1
10	β -Myrcene	1.9	2.4	1.3	1.3
11	3-Octanol	0.1	0.1	0.1	0.1
12	α -Phellandrene	0.3	0.3	0.2	0.2
13	δ -3-Carene	0.1	0.1	0.1	0.1
14	α -Terpinene	2.4	2.2	1.3	1.6
15	p-Cymène	8.4	10.9	8.4	7.8
16	Limonene	0.5	0.3	t	-
17	β -Phellandrene	0.6	0.6	0.6	0.7
18	trans- β -Ocimene	0.1	0.1	0.1	0.1
19	γ -Terpinene	12.1	12.1	8.1	8.5
20	cis-Sabinene hydrate	0.5	0.6	0.7	0.6
21	1-Nonen-3-ol	t	t	t	t
22	Terpinolene	0.1	0.1	0.1	0.1
23	p-Cymenyl	-	t	t	t
24	trans-Sabinene hydrate	0.1	t	t	0.1
25	Linalool	2.2	2.6	3.5	2.7
27	Borneol	0.1	0.1	0.1	0.2
28	4-Terpineol	0.3	0.2	0.2	0.4
29	α -Terpineol	t	-	-	t
31	Thymol methyl ether	t	t	t	t
32	Carvacrol methyl ether	0.4	0.5	0.5	0.5
33	Thymol	0.2	0.3	0.2	0.4
34	Carvacrol	54.4	57.2	66.4	66.8
35	α -Copaene	0.1	0.1	0.1	0.1
36	β -Bourbonene	0.1	0.1	0.1	0.1
37	α -Gurjunene	0.5	0.5	0.5	0.5
38	β -Caryophyllene	0.8	0.6	0.6	0.8
39	β -Gurjunene	0.1	0.1	0.1	0.1

40	Aromadendrene	0.1	0.1	0.1	0.1
41	α -Humulene	t	t	t	t
42	Allo-aromadendrene	0.1	0.2	0.2	0.2
43	γ -Muurolene	0.1	0.1	0.1	0.1
45	Germcrene D	0.1	t	0.1	0.1
46	Ledene	0.2	0.1	0.1	0.1
47	α -Muurolene	t	0.1	0.1	0.1
48	β -Bisabolene	0.1	0.2	0.2	0.2
49	γ -Cadinene	0.1	0.2	0.2	0.2
50	δ -Cadinene	0.2	0.2	0.3	0.2
51	Cadina-1,4-diene	t	t	t	t
52	α -Bisabolene	0.2	0.2	0.2	0.2
53	Palustrol	t	t	0.1	t
54	Spathulenol	0.4	0.5	0.9	0.5
55	Caryophyllene oxide	0.3	0.5	0.5	0.4
56	Viridiflorol	t	t	t	t
57	Ledol	t	-	-	t
58	Isospathulenol	0.1	0.1	0.1	0.1
59	t-Cadinol	0.1	0.1	0.1	0.1
60	β -Eudesmol	0.1	-	0.1	0.1
61	α -Cadinol	0.2	0.1	0.2	0.2

Tableau 34 : Variation des principaux composés et classes de composés (%) en fonction de la durée d'exposition à la lumière

Composés	Huile de référence	Huile exposée à la lumière		
		Pendant 4 jours	Pendant 18 jours	Pendant 40 jours
α -Thujene	2.0	2.3	0.8	1.0
α -Pinene	1.6	1.9	0.6	0.8
β -Myrcene	1.9	2.4	1.3	1.3
α -Terpinene	2.4	2.2	1.3	1.6
p-Cymène	8.4	10.9	8.4	7.8
γ -Terpinene	12.1	12.1	8.1	8.5
Linalool	2.2	2.6	3.5	2.7
Carvacrol	54.4	57.2	66.4	66.8
Hydrocarbures monoterpéniques	30.5	33.8	21.9	22.5
Monoterpènes oxygénés	58.2	61.5	71.8	71.6
Sesquiterpènes	2.8	2.8	2.9	3.0
Sesquiterpènes oxygénés	1.2	1.3	2.0	1.4

5. Activité antioxydante

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par quatre méthodes différentes : le test du DPPH, le test de piégeage du radical OH[•], la méthode TBA ou TBARS et la mesure du pouvoir réducteur.

5.1. Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•])

Du point de vue méthodologique ce test est recommandé pour sa facilité relative et pour sa précision quant à la mesure de l'activité antioxydante des jus de fruits et légumes ou d'autres extraits tels que les huiles essentielles. Les résultats de ce test sont hautement reproductibles et comparables à d'autres méthodes de piégeage des radicaux libres tel que l'ABTS ou 2,2-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate) (237).

Ce test est très largement utilisé dans les études de l'activité antioxydante. Il fait partie des tests en systèmes modèles qui, rappelons le, évitent d'oxyder le substrat sur lequel on veut tester l'efficacité d'un antioxydant en choisissant, entre autres, de réduire un radical stable.

Dans ce test le radical DPPH[•] fixe un radical H[•] qu'il arrache à l'antioxydant AH. Ainsi, il perd sa couleur violette et son absorbance à 517 nm pour se transformer en DPPH-H de couleur jaunâtre (figure 74). Ce test a lieu directement dans la cuve du spectrophotomètre en milieu méthanolique sans oxygénation et on peut suivre à des intervalles de temps réguliers la cinétique d'établissement de l'équilibre.

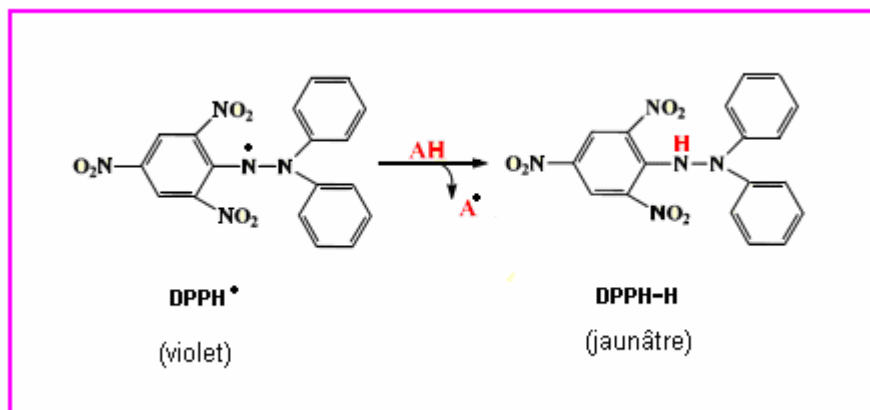


Figure 74 : Réaction du radical DPPH[•] avec un antioxydant AH

5.1.1. Activité de piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles de l'origan

L'activité de piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles des échantillons d'origan (à l'exception de celui de Kadiria) ainsi que celle du BHA et du BHT a été déterminée après 5 minutes de réaction. Les résultats obtenus exprimés en terme de concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC₅₀) (tableau 35) montrent que cette dernière varie dans l'intervalle 378.2 – 521.1mg/L pour les huiles essentielles. L'antioxydant synthétique BHA a manifesté la plus grande aptitude à réduire le DPPH (IC₅₀=126.4mg/L). La valeur trouvée pour l'origan d'Ouled Slama est pratiquement équivalente à celle du BHT. Les autres valeurs d'*Origanum glandulosum*, si on les compare à celles rapportées par d'autres auteurs pour des origans appartenant à la même classe (*Origanum vulgare*) on constate que nos huiles sont d'une efficacité meilleure (170). Ces auteurs rapportent une IC₅₀ de 8900 mg/L pour une réaction de 30 minutes qui donne aussi pour le BHT une valeur de 19.8 mg/mL. D'autres auteurs ont récemment étudié l'activité d'*Origanum glandulosum* de Sétif et d'autres

régions ainsi que des plantes commerciales et rapportent des valeurs des IC₅₀ qui s'échelonnent entre 16.2 et 26.7 mg/mL et ce pour des mesures prises après 16 heures d'incubation des huiles essentielles avec le DPPH (230). Pour une incubation de 20 à 30 minutes tous les auteurs rapportent une valeur entre 18.2 et 19.8 mg/L pour le BHT. Si on fait la correspondance avec une valeur moyenne entre ces deux valeurs du BHT soit 19 mg/mL et la plus haute valeur que nous avons trouvé pour nos échantillons soit 521.1 mg/L, on trouve que cette dernière correspond à 26.8 mg/L et que toutes les autres valeurs se trouvent dans l'intervalle de temps trouvé par ces auteurs pour 23 échantillons d'*Origanum glandulosum*. Il est très difficile de trouver une relation claire et nette entre la composition chimique et particulièrement entre les teneurs des principaux composés et le pouvoir de piégeage du radical DPPH. Cependant, tous les auteurs s'accordent à dire que les phénols (thymol et carvacrol) sont les principaux facteurs qui favorisent l'activité.

Tableau 35 : Activité de piégeage du radical DPPH par le BHA, BHT et les huiles essentielles de l'origan

Huile essentielle / Substance	IC ₅₀ ^x ±SD
BHA	126,4±12.4a
BHT	369,1±12.4b
<i>O. glandulosum</i> Ighzer Amokrane	480.2±12.4de
<i>O. glandulosum</i> Ouled Slama	378.2±12.4b
<i>O. glandulosum</i> Souhane	434.1±12.4c
<i>O. floribundum</i> Chrea	477.3±12.4d
<i>O. floribundum</i> Hammam Melouane	521.1±12.4e

^x Concentration (mg/L ou ppm pour une inhibition de 50 % des radicaux).

SD, standard déviation.

Les moyennes comportant des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

5.1.2. Activité de piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles du thym

5.1.2.1. Huiles essentielles de *T. munbyanus*, *T. numidicus*, *T. pallescens* (Tablat) et *T. guyonii*

Le pouvoir de piégeage du radical DPPH des huiles essentielles de ces quatre espèces de thym sera exposé séparément de celui des autres *Thymus* car les huiles de ces espèces ont non seulement été testées séparément mais aussi parce que la réaction d'inhibition a été testée pour 5 minutes comme pour les *Origanum* ce qui n'est pas le cas pour le reste des échantillons des *Thymus* comme nous le verrons par la suite.

A notre connaissance, aucun *Thymus* d'Algérie n'a encore fait l'objet d'une étude pour son activité antioxydante et par conséquent aucune donnée sur ce sujet n'est encore disponible.

Les résultats du pouvoir de piégeage du DPPH par les huiles essentielles de ces 4 espèces montrent que *T. pallescens* est le plus actif et son activité est comparable à celle du BHT (tableau 36). Compte tenu de la teneur élevée en carvacrol (41.6%) qui est supposé jouer avec le thymol un rôle important dans l'activité biologique d'une huile essentielle (87, 182, 183), ce résultat était prévisible. *Thymus guyonii* qui est le plus pauvre en thymol et en carvacrol est l'espèce la moins active. Mais, une haute teneur en ces deux phénols ne peut pas à elle seule expliquer l'activité d'une huile essentielle. En effet, *T. numidicus* qui est pauvre en ces deux phénols par rapport à *T. munbyanus* a manifesté une aptitude à inhiber le radical DPPH, équivalente à celle de ce dernier. Ce

phénomène, a déjà été signalé par d'autres auteurs pour des huiles riches en α -terpineol pour d'autres tests d'activité antioxydante (103). Donc, il semblerait que ce composé joue un rôle important dans l'inhibition de certains facteurs oxydatifs.

Tableau 36 : Activité de piégeage du radical DPPH par le BHA, le BHT et les huiles essentielles de *T. munbyanus*, *T. pallescens*, *T. numidicus* et *T. Guyonii*

Huile essentielle / Substance	IC ₅₀ ^x ±SD
BHA	126,4±18.0a
BHT	369,1±18.0b
<i>T. munbyanus</i>	542.6±18.0d
<i>T. pallescens</i>	410.2±18.0bc
<i>T. numidicus</i>	597.7±18.0d
<i>T. guyonii</i>	826.5±18.0e

^x Concentration (mg/L ou ppm pour une inhibition de 50 % des radicaux).

SD, standard déviation.

Les moyennes comportant des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

5.1.2.2. Huiles essentielles de *T. dreatensis*, de *T. algeriensis* et de *T. pallescens* de différentes régions

Les échantillons de *T. dreatensis*, de *T. algeriensis* provenant de Chréa (800 et 1500m altitude) et d'El Asnam et de *T. pallescens* de Sidi Aissa, Boussaâda, Oued Rhiou Kadiria et El Asnam ont été testés pour leur capacité d'inhiber ou de piéger le radical DPPH pour une durée d'inhibition de 20 minutes. Le tableau 37 rassemble les résultats obtenus pour des concentrations variant de 100 à 1000 mg/L.

A l'exception de *Thymus pallescens* de Sidi Aissa (TP1) qui a montré une activité presque égale à celle des antioxydants de synthèse aux concentrations de 800 et 1000 mg/L, tous les autres échantillons contenant le thymol ou le carvacrol parmi leur principaux composés ont des activités équivalentes en fonction des concentrations. Ces activités sont faibles pour les concentrations 100 et 200 mg/L et relativement importantes pour les autres. Les deux nouveaux chémotypes de *T. algeriensis* (ALG2 et ALG3) ont manifesté une très faible activité pour toutes les concentrations, et l'absence de thymol et/ou de carvacrol dans la composition chimique de ces deux échantillons peut partiellement expliquer ce comportement.

5.1.2.3. Huiles essentielles des deux fractions issues de la distillation de *T. pallescens* de Boussaâda

Les deux fractions F1 et F2 issues de la distillation de l'huile essentielle de *T. pallescens* de Boussaâda testées pour leur capacité d'inhiber les radicaux DPPH[•] ont fourni deux profils de comportements différents (figure 75). La fraction F1 riche en hydrocarbures monoterpéniques et contenant 43.1% de carvacrol a eu un comportement presque identique à celui de l'huile essentielle entière atteignant pour toutes les concentrations des activités très proches de celles de l'huile dont elle est issue. Cette dernière contient une teneur en carvacrol (46.9%) proche de celle de la fraction 1 et cela peut être l'une des causes de cette similarité. Par contre la fraction 2 qui est très riche en carvacrol (81.4%) a fourni une activité pour 100 mg/L équivalente à celles de 600-1000 mg/L de l'huile entière et elle a très rapidement atteint une valeur stable moyenne de 73.6% dès la concentration de 200 mg/L. Ce résultat nous paraît intéressant s'il venait à être confirmé pour d'autres huiles

puisque'il permet d'obtenir une meilleure efficacité pour une faible concentration (200mg/L) par rapport à la plus haute concentration de l'huile entière (1000mg/L).

Tableau 37 : Activité de piégeage (%) du radical DPPH par le BHA, le BHT et les huiles essentielles de *T. dreatensis*, *T. algeriensis* et *T. palleescens* de différentes régions

Echantillon*	Activité de piégeage (% , moyenne±SD), concentrations (mg/L)					
	100	200	400	600	800	1000
TP1	19.0±0.2c	34.9±1.0c	62.4±1.7c	77.0±0.1b	93.2±0.0a	93.4±0.0a
TP2	13.1±0.3d	24.7±0.4d	39.5±0.6e	49.5±0.4d	54.8±0.4e	59.9±0.4f
TP3	12.3±0.2d	26.5±0.4d	41.3±0.3de	51.6±0.1d	58.0±0.7d	62.0±0.1e
TP4	12.2±0.2d	25.9±0.2d	42.3±0.6d	58.7±0.6c	69.7±0.6c	75.1±0.2c
TP5	10.1±0.4e	22.3±0.1e	34.7±0.2f	46.0±0.0e	52.1±0.1f	63.3±0.1d
ALG1	8.3±0.4f	19.6±0.7f	32.4±0.4g	41.8±0.3f	47.6±0.3h	53.4±0.2h
ALG2	3.1±0.2g	3.4±0.2g	3.8±0.1h	4.2±0.2g	5.3±0.5j	6.3±0.3j
ALG3	1.6±0.0 h	2.6±0.1g	3.8±0.1h	4.6±0.1g	6.9±0.1i	7.8±0.2i
TDR	10.7±0.1e	18.5±0.1f	32.2±0.2g	42.0±1.2f	50.4±0.7g	58.2±1.0g
BHA	91.7±0.4a	91.4±0.3a	92.1±0.7a	93.1±0.1a	93.3±0.0a	93.3±0.0a
BHT	88.5±0.6b	87.5±0.2b	88.2±0.7 b	90.5±2.9a	91.8±0.1b	91.3±0.1b

Dans chaque colonne, les moyennes comportant des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0.05$). SD : standard déviation. * TP1-TP5 : *Thymus palleescens* de Sidi Aissa, Boussaâda, Oued Rhiou, Kadiria et El Asnam ; ALG1, *T.algeriensis* de Chréa (800m altitude), ALG2, *T. algeriensis* de Chréa (1500m) et ALG3, *T. algeriensis* d'El Asnam (Bouira) ; TDR, *T. dreatensis*.

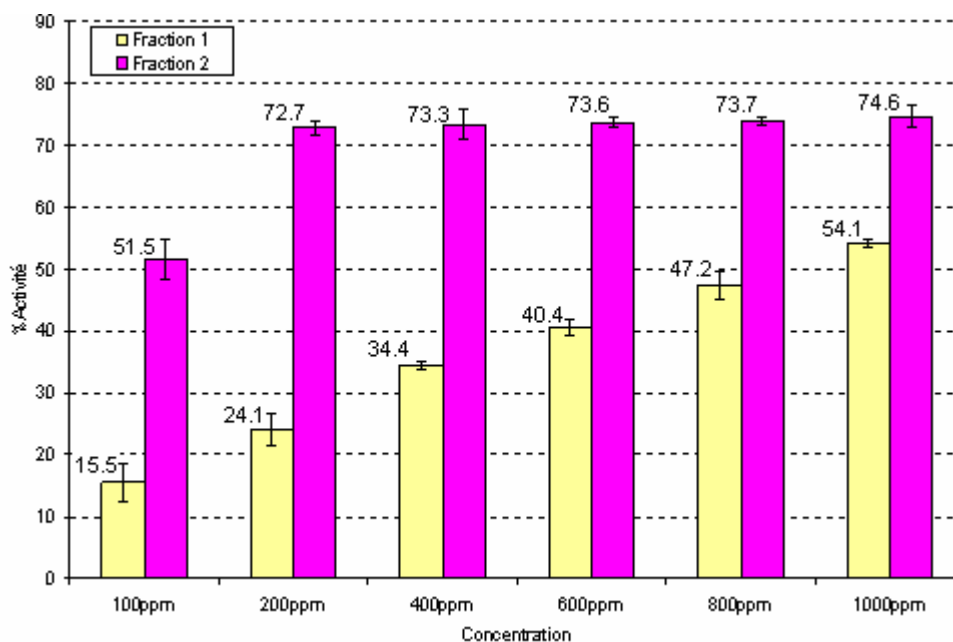


Figure 75 : Activité de piégeage du radical DPPH par les huiles des fractions 1 et 2 issues de la distillation de l'huile essentielle de *T. palleescens* de Boussaâda

5.2. Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

Parmi les conséquences de l'oxydation des lipides, il y a la formation de produits secondaires d'oxydation dont les aldéhydes en font partie. Il y a plusieurs méthodes pour analyser les différents produits secondaires (analyse sensorielle, analyse des aldéhydes, analyse des produits volatils...). Pour l'analyse des aldéhydes le test qui a été et demeure le plus répandu des tests de mesure du degré d'oxydation des acides gras insaturés est celui de la réaction au **TBA** (acide thiobarbiturique), avec parfois de légères modifications. Ce test a été réalisé sur différents substrats riches en lipides oxydables parmi lesquels on peut citer le saindoux, le cholestérol, les matières grasses, l'acide linoléique, les huiles végétales, le jaune d'œuf, le foie de rat etc. (238).

Test à l'acide 2-thiobarbiturique (TBA) : Dans ce test une molécule de malonaldéhyde (**MA**) réagit avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (**TBA**) pour former un complexe de couleur rose à rouge absorbant à 532 nm (figure 76). Il est à noter que l'expression souvent employée dans la littérature de « *malondialdéhyde* » (**MDA**) est incorrecte, puisqu'il s'agit d'un monoénol/monoaldéhyde (168).

MA se formerait uniquement à partir des acides gras comportant au moins trois doubles liaisons. De ce fait, le test au **TBA** ne prend pas en compte les dérivés du linoléate ou de l'oléate (239). Mais, **MA** n'est pas le seul produit d'oxydation à réagir avec le TBA : les 4-hydroxyalkénals, les 2-4-alkadiénals, les 2-alkénals forment également un chromogène (240). C'est la raison pour laquelle on préfère parler de « **substances réactives au TBA** » (**SRTBA**) ou **TBARS** en Anglais (Thiobarbituric Acid Reactive Substances).

Dans tous les cas, la réaction a lieu en milieu acide et à haute température (95-100°C) pour accélérer la vitesse et augmenter la sensibilité.

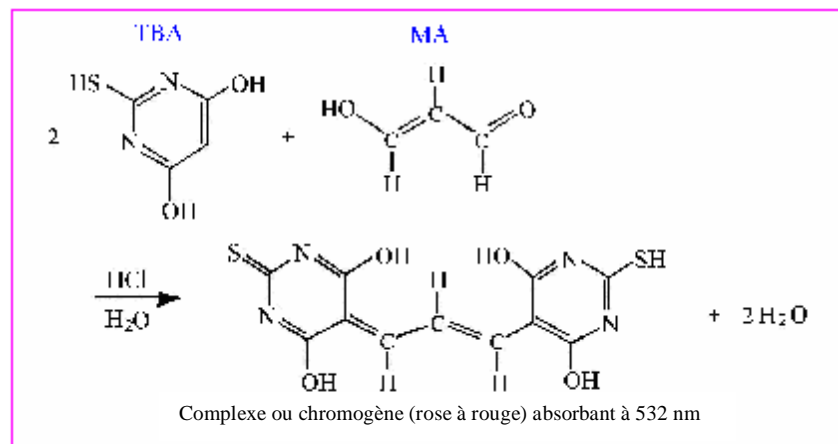


Figure 76 : Réaction du TBA avec le malonaldéhyde pour former un chromogène

La chaîne de réactions d'oxydation peut être accélérée encore plus par un **initiateur radicalaire** tel que le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (**ABAP**) dont la structure chimique est la suivante :

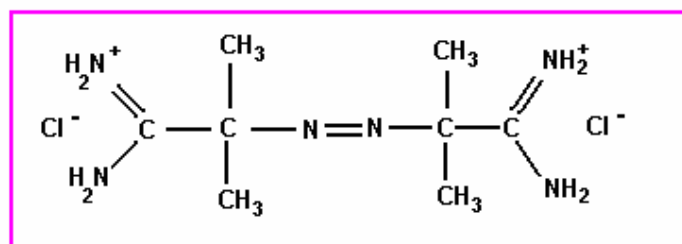


Figure 77 : Structure chimique de l'initiateur de radicaux libres, le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (**ABAP**)

Cet initiateur de radicaux se décompose rapidement et facilement en phase aqueuse par apport d'énergie ΔE (chauffage) pour donner deux radicaux et de l'azote gazeux (figure 78). Les radicaux formés réagissent avec l'oxygène dissout pour former des radicaux peroxydes capables d'arracher des hydrogènes des acides gras polyinsaturés.

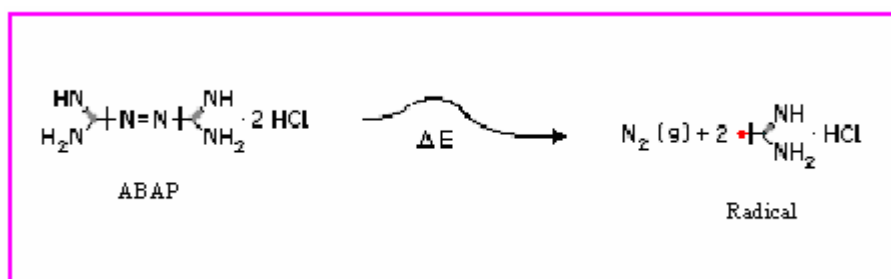


Figure 78 : Décomposition de l'initiateur de radicaux ABAP

Dans ce travail nous avons testé **neuf** échantillons en présence de cet initiateur et en son absence, tandis que tous les autres échantillons ont été testés en sa présence seulement. Le substrat riche en lipides utilisé est le **jaune d'œuf**.

5.2.1. Activité des huiles essentielles de l'origan

Dans la série d'expériences où les échantillons ont été testés en l'absence de l'initiateur de radicaux, toutes les huiles ont manifesté une activité protectrice élevée contre la peroxydation même pour les faibles concentrations (50 et 100mg/L), (tableau 38). A l'exception de l'échantillon d'Ouled Slama, les échantillons d'origan ont montré un comportement similaire sur tout l'intervalle de concentrations testées avec de légères différences entre les taux de leurs activités. Le pouvoir antioxydant de tous les échantillons devient après la concentration de 250 mg/L à être comparable ou supérieur à celui des antioxydants de synthèse (BHA et BHT), surtout les huiles des échantillons d'*O. floribundum* aux concentrations 750 et 1000 mg/L. Il semblerait que le carvacrol, qui est le composé principal de l'huile essentielle de l'origan de Chréa, est responsable de cette différence par rapport aux autres échantillons d'origan. Le tocophérol a une activité très élevée pour toutes les concentrations. Les résultats relatifs à *O. floribundum* de Chréa sont légèrement supérieurs par rapport à ceux obtenus par Chikhouné qui rapporte des valeurs des valeurs variant entre 50.3 pour la 100mg/L et 81.4% pour 1000mg/L (267).

Quand l'ABAP a été ajouté au mélange réactionnel dans la deuxième série d'expériences toutes les huiles enregistrent des variations qui vont généralement dans le sens de la diminution (tableau 39). Cette diminution est peu significative pour les concentrations 750 et 1000 mg/L. Le BHA quant à lui enregistre une augmentation de

son activité. Selon certains auteurs (241-243), l'explication de ce phénomène est d'ordre structural. Ainsi, d'après ces auteurs, le BHA et le tocophérol ont un encombrement stérique moindre autour de la fonction phénol par rapport au BHT ce qui facilite leur action inhibitrice.

Nos résultats pour les échantillons d'*O. glandulosum* sont en accord avec ceux rapportés par d'autres auteurs pour des échantillons de la même espèce provenant de différentes localités de la région de Sétif (tableau 40) et dont nous avons précédemment donné les principaux composés de leur composition chimique. Pour *O. floribundum* de chrea les résultats sont en accord avec ceux de Chikhounne qui rapporte des valeurs variant entre 43.3 et 85.2% (267).

Tableau 38 : Activité antioxydante (%) du BHT, BHA, tocopherol et des huiles essentielles de l'origan à différentes concentrations (mg/L) en utilisant le test TBARS en l'absence de l'initiateur de radicaux ABAP

Huile essentielle/Substance	Concentration, moyennes \pm SD (mg/ L)					
	50	100	250	500	750	1000
BHA	52.3 \pm 4.0bc	61.5 \pm 3.8b	69.4 \pm 3.0b	75.9 \pm 2.8bc	81.2 \pm 2.0cde	83.4 \pm 2.1abc
BHT	61.0 \pm 4.0ab	63.9 \pm 3.8b	76.7 \pm 3.0ab	77.8 \pm 2.8bc	78.6 \pm 2.0de	80.4 \pm 2.1c
Tocopherol	70.8 \pm 4.0a	77.5 \pm 4.1a	82.3 \pm 2.8a	89.2 \pm 2.8a	89.4 \pm 1.9ab	90.2 \pm 2.1a
<i>O. glandulosum</i> Ighzer Amokrane	45.1 \pm 3.8bcd	60.1 \pm 4.1b	75.1 \pm 2.8ab	80.8 \pm 2.8bc	83.1 \pm 2.0bcd	85.5 \pm 2.1abc
<i>O. glandulosum</i> Ouled Slama	37.4 \pm 3.8d	46.2 \pm 3.8c	56.9 \pm 2.8c	73.8 \pm 2.8c	76.3 \pm 2.0e	82.6 \pm 2.0bc
<i>O. glandulosum</i> Souhane	44.1 \pm 3.8cd	60.6 \pm 3.8b	72.1 \pm 2.8ab	76.8 \pm 3.1bc	83.1 \pm 1.9bcd	85.0 \pm 2.1abc
<i>O. floribundum</i> Chrea	53.9 \pm 4.0bc	71.8 \pm 4.7ab	76.6 \pm 3.4ab	84.7 \pm 3.1ab	89.9 \pm 1.9a	90.1 \pm 2.0a
<i>O. floribundum</i> Hammam Melouane	47.1 \pm 3.8cd	62.7 \pm 3.8b	81.2 \pm 3.0a	76.8 \pm 2.8bc	86.3 \pm 1.9abc	88.7 \pm 2.0ab

SD, standard déviation.

Dans chaque colonne, les moyenne avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

Tableau 39 : Activité antioxydante (%) du BHT, BHA, tocopherol et des huiles essentielles de l'origan à différentes concentrations (mg/L) en utilisant le test TBARS en présence de l'initiateur de radicaux ABAP

Huile essentielle/Substance	Concentration, moyenne \pm SD (mg/ L)					
	50	100	250	500	750	1000
BHA	62.6 \pm 2.5a	70.9 \pm 4.0a	80.9 \pm 2.4a	86.5 \pm 2.8a	87.0 \pm 3.7a	89.6 \pm 1.4a
BHT	42.0 \pm 2.5bc	50.5 \pm 4.0cd	63.0 \pm 2.4b	66.0 \pm 2.8bc	73.4 \pm 3.7bc	72.9 \pm 1.4c
Tocopherol	65.7 \pm 2.5a	83.7 \pm 4.0a	88.0 \pm 2.4a	88.5 \pm 2.8a	90.0 \pm 3.7a	91.3 \pm 1.4a
<i>O. glandulosum</i> Ighzer Amokrane	21.8 \pm 2.5d	40.8 \pm 4.0de	51.5 \pm 2.4c	63.1 \pm 2.8cd	68.6 \pm 3.7c	77.0 \pm 1.4c
<i>O. glandulosum</i> Ouled Slama	44.6 \pm 2.5b	59.2 \pm 4.0bc	55.4 \pm 2.4c	63.1 \pm 2.8cd	71.1 \pm 3.7bc	76.4 \pm 1.4c
<i>O. glandulosum</i> Souhane	17.7 \pm 2.5d	33.4 \pm 4.0e	49.6 \pm 2.4c	56.7 \pm 2.8d	71.5 \pm 3.7bc	74.0 \pm 1.4c
<i>O. floribundum</i> Chrea	43.7 \pm 2.5bc	57.8 \pm 4.0bc	68.3 \pm 2.4b	73.5 \pm 2.8b	80.9 \pm 3.7ab	84.2 \pm 1.4b
<i>O. floribundum</i> Hammam Melouane	36.0 \pm 2.5c	48.0 \pm 4.0cde	55.1 \pm 2.4c	72.2 \pm 2.8b	80.9 \pm 3.7ab	82.4 \pm 1.4b

Dans chaque colonne, les moyenne avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

Tableau 40 : Activité antioxydante (%) des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* de différentes localités de la région de Sétif à différentes concentrations (mg/L) en utilisant le test TBARS en présence de l'initiateur de radicaux ABAP (135)

Echantillon	100mg/L	500 mg/L	1000 mg/L
Ouled Iyiche	47.6±2.1	59.5±0.8	63.2±2.8
Djebel Megriss	48.8±1.2	59.5±0.4	66.2±0.3
Anini	47.8±1.3	57.3±3.8	66.3±1.4
Tafat	52.8±0.2	61.8±1.0	67.9±0.6

5.2.2. Activité des huiles essentielles du thym

5.2.2.1. Huiles essentielles de *T. munbyanus*, *T. numidicus*, *T. pallescens* (Tablat) et *T. guyonii*

Les huiles essentielles de ces espèces sont les seules à avoir été testées en l'absence et en présence de l'initiateur de radicaux (ABAP). En l'absence de l'ABAP toutes les huiles ont généralement montré de grandes capacités à inhiber la peroxydation des lipides, particulièrement *Thymus munbyanus* et *T. pallescens* dont les activités sont équivalentes à celles du tocophérol et supérieures à celles du BHA et du BHT pour les concentrations élevées (figure 79). Ces deux espèces se différencient des deux autres par leurs teneurs cumulées plus élevées en thymol et carvacrol qui pourraient être à la base de la différence de leurs activités par rapport à *T. guyonii* et *T. numidicus* (chénotype à α -terpineol).

En présence de l'ABAP (figure 80) toutes les huiles, à l'instar de celles de l'origan, ont enregistré une diminution de leurs activités pour toutes les concentrations (95c), particulièrement pour les faibles concentrations (50 et 100mg/L). Cette diminution est beaucoup plus marquée pour *T. guyonii* qui est le plus pauvre en thymol et/ carvacrol. Par contre, la diminution d'activité de *T. numidicus* est comparable à celles de *T. munbyanus* et *T. pallescens* bien que le premier cité soit plus pauvre en thymol et carvacrol. Donc, une fois de plus on constate que l' α -terpineol joue un rôle important dans l'inhibition de l'activité de l'oxydation. En plus de son activité appréciable, l'huile essentielle de *T. numidicus* a une odeur plus douce et plus agréable par rapport à celles des trois autres espèces et cela constitue un avantage non négligeable quand on sait l'importance tant pour l'industriel que pour le consommateur, du critère d'acceptabilité d'un additif alimentaire.

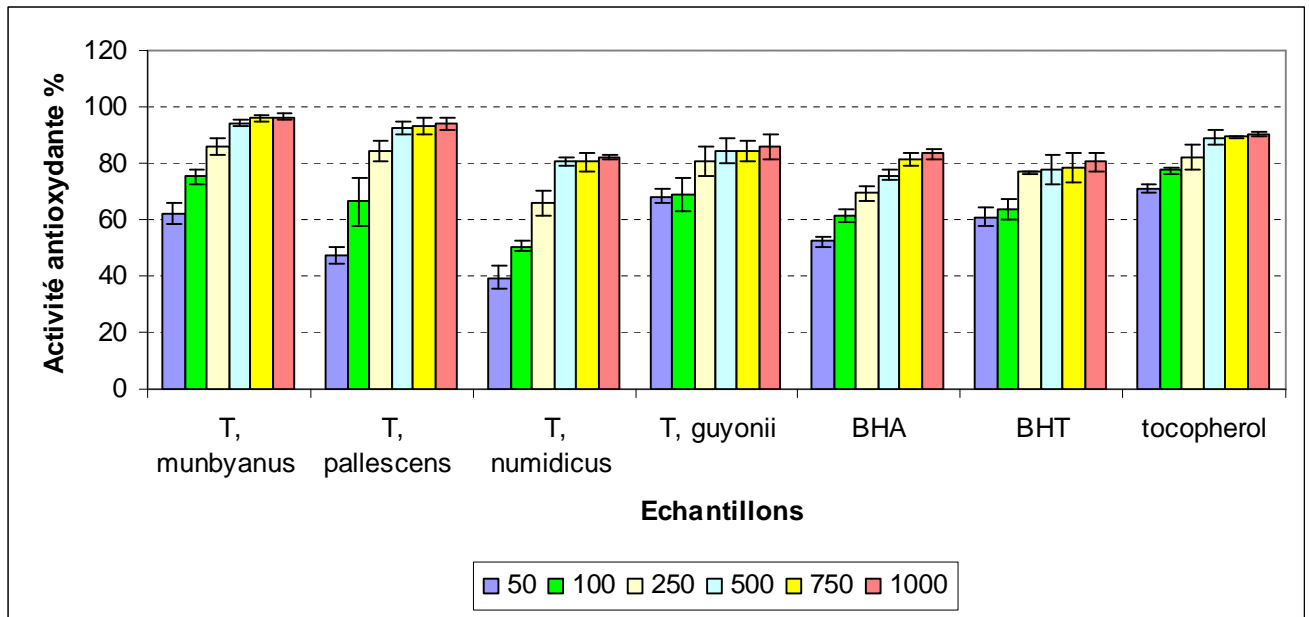


Figure 79 : Activité antioxydante (%) des huiles essentielles de *T. munbyanus*, *T. numidicus*, *T. pallescens* (Tablat) et *T. guyonii* à différentes concentrations (mg/L) en utilisant le test TBARS en l'absence de l'initiateur de radicaux ABAP

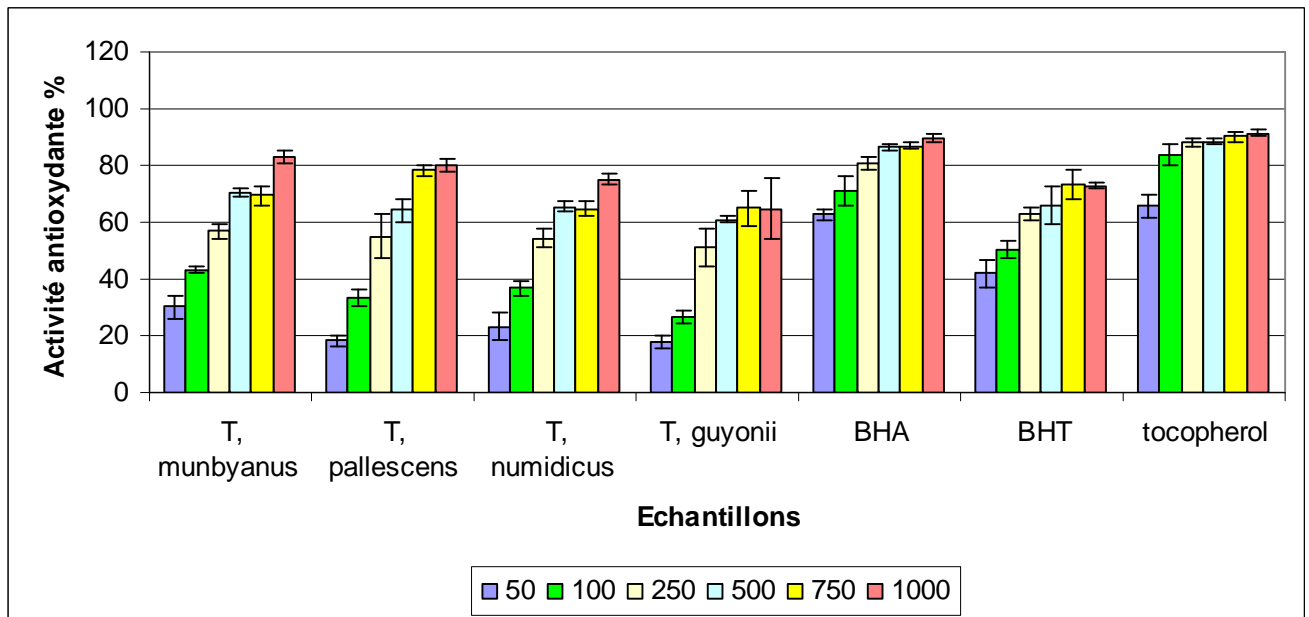


Figure 80 : Activité antioxydante (%) des huiles essentielles de *T. munbyanus*, *T. numidicus*, *T. pallescens* (Tablat) et *T. guyonii* à différentes concentrations (mg/L) en utilisant le test TBARS en présence de l'initiateur de radicaux ABAP

5.2.2.2. Huiles essentielles de *T. algeriensis*, *T. pallescens* de différentes régions et de *T. dreatensis*

L'activité antioxydante exprimée en terme de IC_{50} du BHT, des huiles essentielles de *T. dreatensis*, de 3 échantillons de *T. algeriensis* et de 5 autres de *T. pallescens* de différentes régions (tableau 41) montre des profils différents pour les échantillons de *T. algeriensis*. Ainsi, l'huile essentielle de l'échantillon de Chréa appartenant au chémotype à thymol (Chréa 800 m d'altitude) a exhibé l'effet antioxydant le plus important

($IC_{50}=106.7 \mu\text{g/ml}$), celle de l'échantillon du même lieu cueilli à 1500m d'altitude a été inactive tandis que celle d'El Asnam a montré la plus faible activité. Malgré les compositions chimiques similaires de 4 échantillons de *T. pallescens* appartenant au chémotype à carvacrol, deux d'entre eux (*T. pallescens* de Sidi Aissa et *T. pallescens* de Kadiria) ont des activités équivalentes tandis que les deux autres (*T. pallescens* de Oued Rhiou et *T. pallescens* d'El-Asnam) ont des activités très différentes. Le cinquième échantillon (*T. pallescens* Boussaada) a une activité très proche de celle du BHT. Cette disparité dans l'inhibition de la peroxydation lipidique des échantillons de *Thymus pallescens* appartenant au même chémotype à carvacrol pourrait être due à la réaction de certains composés ayant une activité prooxydante (243).

Tableau 41: IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) du BHT, des huiles essentielles de *T. algeriensis*, *T. pallescens* de différentes régions et de *T. dréatensis* dans le test d'inhibition de la peroxydation lipidique par la réaction au TBA (TBARS)

Huile essentielle de thym	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>T. pallescens</i> Sidi Aissa	416.3±6.5d
<i>T. pallescens</i> Boussaada	192.5±9.1b
<i>T. pallescens</i> Oued Rhiou	314.3±6.8c
<i>T. pallescens</i> Kadiria	467.4±3.8d
<i>T. pallescens</i> El-Asnam	614.2±3.3e
<i>T. algeriensis</i> Chréa (800m)	106.7±8.4a
<i>T. algeriensis</i> Chréa (1500m)	inactive
<i>T. algeriensis</i> El-Asnam	911.6±7.4f
<i>T. dréatensis</i>	277.3±13.6b
BHT	173.4±4.2b

Les moyennes (\pm SD) avec des lettres différentes sont significativement différentes ($P<0.05$).

5.3. Activité de piégeage du radical hydroxyle (OH^{\bullet})

L'oxygène (ou dioxygène, O_2) est un gaz indispensable à la vie. A l'exception de certains organismes anaérobies, l'oxygène est nécessaire à tous les animaux, plantes et bactéries pour produire de l'énergie par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons telles que celle existant dans les mitochondries des cellules eucaryotes (188).

Le dysfonctionnement du métabolisme de l'oxygène génère un excès d'espèces chimiques très réactives connues sous le nom d'«**espèces réactives de l'oxygène**» (ERO) ou (ROS) en Anglais «reactive oxygen species», parmi lesquelles il y a les radicaux libres tels que le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) et le radical peroxyde ou peroxyde (RO_2^{\bullet}) ainsi que des produits non radicalaires tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces espèces, et particulièrement les radicaux libres, causent des dégâts sur les macromolécules biologiques (ADN, lipides, protéines), qui peuvent troubler considérablement le mécanisme des

cellules. Le stress oxydatif est impliqué dans de nombreuses pathologies (athérosclérose, diabète, maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer, cancer...) ainsi que le processus de vieillissement. Les antioxydants visent à plus ou moins inhiber les dégâts générés par les ERO. Ainsi, on rencontre dans la littérature différents tests d'inhibition de ces espèces réactives de l'oxygène.

Espèces réactives de l'oxygène et inhibition du radical hydroxyle

La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons) conduisant à la production d'eau : $O_2 + 4 e^- + 4 H^+ \longrightarrow 2H_2O$

D'un point de vue formel, la réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'ajouter un par un, successivement sur $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , et OH^{\cdot} (figure 81). Ces intermédiaires sont appelés espèces réactives de l'oxygène (**ERO**) ou encore espèces activées de l'oxygène, car ils ont une réactivité beaucoup plus importante que celle de l'oxygène qui leur a donné naissance.

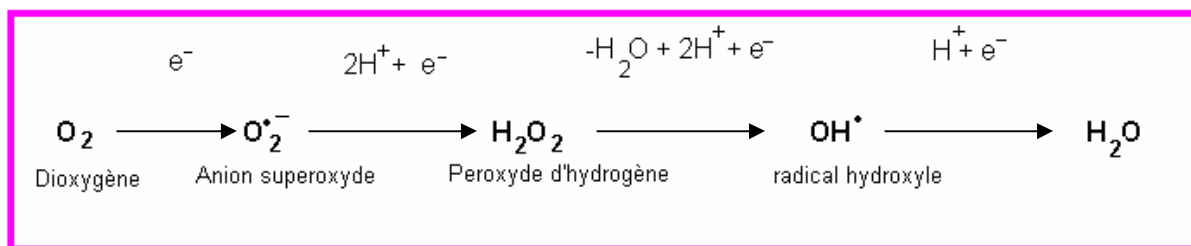


Figure 81 : Intermédiaires réduits de l'oxygène : les 4 étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène

Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des systèmes de défense (enzymatiques et non enzymatiques), ou encore par une association de ces deux phénomènes. Un tel déséquilibre entre systèmes producteurs d'**ERO** et systèmes de défense caractérise l'état de **stress oxydatif** (244).

Le radical hydroxyle est (après le fluor) l'oxydant le plus puissant de la nature et c'est le radical le plus dommageable du stress oxydatif. Les radicaux hydroxyles attaquent tous les matériaux biologiques (ADN, protéines, lipides...). Par exemple, dans le cas de l'ADN, ce radical réagit avec les bases en s'additionnant sur les doubles liaisons. Il peut également réagir sur les doubles liaisons des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines, initiant ainsi des chaînes de peroxydation lipidique. De même, les acides aminés constitutifs des protéines sont très sensibles à l'attaque des radicaux hydroxyles. Donc, l'inhibition de ce radical, le plus agressif des ERO, est très importante.

La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle OH^{\cdot} en présence de cations métalliques tels que Fe^{+2} selon la réaction de **Fenton** :

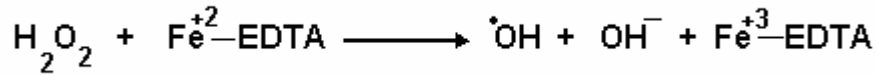


Réaction de **Fenton**

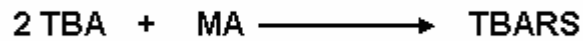
Comme nous l'avons indiqué auparavant le test de l'inhibition du radical $^{\cdot}OH$ est basé sur cette réaction. **Halliwell** et **Gutteridge** ont développé un système pour évaluer la peroxydation des lipides par les radicaux

libres de l'oxygène dans le but de son utilisation dans les recherches médicales et biologiques (245). Cette méthode est basée sur la réaction de **Fenton** et permet de détecter l'auto oxydation non enzymatique.

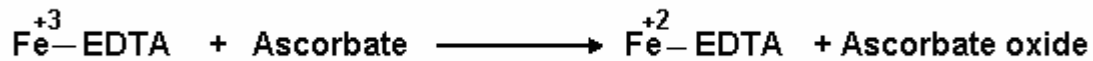
En solution aqueuse, le complexe Fe^{+2} -EDTA s'auto oxyde lentement pour former le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) qui se transforme rapidement à $\text{pH} = 7,4$ en H_2O_2 . L'interaction de ce dernier avec le fer Fe^{+2} conduit à la formation de radicaux $\cdot\text{OH}$ selon la réaction suivante, en présence d'acide ascorbique en tant que catalyseur :



Les radicaux libres $\cdot\text{OH}$ attaquent les liaisons insaturées des lipides ou fragmentent le 2-deoxy-D-ribose pour former principalement du malonaldehyde (**MA**), qui peut être détecté grâce à sa capacité de réagir avec l'acide thiobarbiturique (**TBA**) pour former un chromogène rose (**TBARS**) (246).



Le rôle de l'ascorbate est de réduire le fer Fe^{+3} en fer Fe^{+2} et ainsi favoriser la réaction de Fenton :



Dans ce test, l'addition d'huile essentielle ou tout autre antioxydant se manifestera par une inhibition partielle ou totale des radicaux hydroxyles qui se forment. Cette inhibition ou pouvoir de piégeage du radical hydroxyle sera mesurée par rapport à un témoin négatif, à l'instar de tous les autres tests, constitué par tous les réactifs sans addition d'huile essentielle ou un autre antioxydant. Donc, plus l'activité sera grande et plus il y aurait moins de TBARS et par conséquent la couleur rose sera moins intense.

Ce test, on le trouve dans la littérature sous une autre forme modifiée qui n'utilise pas l'EDTA (247), cette méthode est appelée méthode du « **site spécifique** ».

Les valeurs du pouvoir de piégeage du radical hydroxyle par les huiles essentielles des échantillons de l'origan et du thym évaluées en terme de IC_{50} (tableaux 42 et 43 respectivement) montre que cette concentration inhibitrice varie entre 7.5 et 100.2 $\mu\text{g/ml}$ pour les huiles essentielles de l'origan et entre 2.2 et 8.6 $\mu\text{g/ml}$ pour le thym. Les huiles essentielles du thym ont manifesté une meilleure efficacité d'inhiber le radical hydroxyle par rapport à celles de l'origan. En effet, la valeur maximale des IC_{50} des échantillons du thym est équivalente à la valeur minimale obtenue avec ceux de l'origan.

En ce qui concerne l'origan, *O. glandulosum* de Souhane a été le moins actif ($\text{IC}_{50}=100.2\mu\text{g/ml}$) tandis que celui d'Ouled slama a été le plus actif ($\text{IC}_{50}=7.5\mu\text{g/ml}$). Il y a lieu de remarquer qu'*O. glandulosum* d'Ouled Slama a jusqu'à présent été le plus efficace dans tous les tests de l'activité antioxydante (DPPH, TBARS et radical hydroxyle) par rapport aux deux autres échantillons de la même espèce bien que leurs compositions chimiques soient similaires. A l'exception d'*O. glandulosum* de Souhane ($\text{IC}_{50}=100.2\mu\text{g/ml}$) dont l'activité est la plus faible, les activités des autres échantillons sont supérieures à celle du témoin positif (mannitol).

Les *Thymus* ont été de très bons inhibiteurs ou « scavengers » vis-à-vis du radical hydroxyle en donnant tous des IC_{50} inférieures à celle du mannitol. A l'exception de *T. pallescens* de Sidi Aissa ($\text{IC}_{50}=2.3\mu\text{g/ml}$), les

autres échantillons de cette espèce ainsi que celui de *T. algeriensis* appartenant au chémotype à thymol et celui de *T. munbyanus* ont fourni des valeurs plus ou moins équivalentes. *T. numidicus* (chémotype à α -terpineol) a produit la plus grande activité. Les deux échantillons de *T. algeriensis* qui ne contiennent pas de thymol et qui sont très pauvres en carvacrol (t-0.2%) ont fourni, avec *T. dreatensis*, les activités les plus hautes après celle de *T. numidicus*. Il est très difficile de trouver une relation claire entre les teneurs des principaux composés de ces huiles et le pouvoir inhibiteur des radicaux hydroxyles. Toutefois, l'absence ou la faible concentration des deux phénols (thymol et carvacrol) des compositions chimiques de deux échantillons de *T. algeriensis* semblent favoriser l'activité de piégeage du radical hydroxyle.

Tableau 42 : Valeurs des IC₅₀ (μ g/ml) du mannitol et des huiles essentielles des échantillons d'*O. floribundum* et d'*O. glandulosum* dans le test de l'inhibition du radical hydroxyle

Huiles essentielles/ Mannitol	IC50 (μ g/ml)
<i>O. floribundum</i> Chréa	12.0 \pm 0,5c
<i>O. floribundum</i> Hammam Mélouane	23,533 \pm 0,25d
<i>O. Glandulosum</i> Béjaia	14,166 \pm 0,2c
<i>O. Glandulosum</i> Souhane	100,2 \pm 4,1e
<i>O. glandulosum</i> Ouled Slama	7,5 \pm 0,1a
Mannitol	26,42 \pm 0,4 d

Les moyennes (\pm SD) avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

Tableau 43 : Valeurs des IC₅₀ (µg/ml) du mannitol et des huiles essentielles des échantillons du thym dans le test de l'inhibition du radical hydroxyle

Huile essentielle /mannitol	IC50 (µg/ml)
<i>T. pallescens</i> Sidi Aissa	2.3±0.1b
<i>T. pallescens</i> Boussaada	8.6±0.3h
<i>T. pallescens</i> Oued Rhiou	4.8±0.3d
<i>T. pallescens</i> Kadiria	7.3±0.2g
<i>T. pallescens</i> El-Asnam	6.4±0.1ef
<i>T. pallescens</i> Tablat	7,03 ± 0,4 fg
<i>T. algeriensis</i> Chréa (800m)	8.5±0.1h
<i>T. algeriensis</i> Chréa (1500m)	2.2±0.03b
<i>T. algeriensis</i> El-Asnam	3.3±0.08c
<i>T. dréatensis</i>	3.3±0.1c
<i>T. numidicus</i>	1,07 ± 0,02 a
<i>T. Guyonii</i>	24.0 ± 0,2 i
<i>T. munbyanus</i>	6,1 ± 0,1 e
Mannitol	26.4±0.4j

Les moyennes (± SD) avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

5.4. Pouvoir réducteur

Les figures 82-85 représentent les capacités réductrices des huiles essentielles des échantillons des espèces d'origan, de *T. pallescens*, de *T. algeriensis* et de 4 échantillons de thym appartenant à diverses espèces (*T. guyonii*, *T. numidicus*, *T. munbyanus* et *T. dreatensis*), respectivement, ainsi que celles du BHT, BHA, tocopherol et de l'acide ascorbique.

Le pouvoir réducteur mesure la capacité de réduire le fer Fe³⁺ en Fe²⁺. Les figures 82-85 montrent que les huiles essentielles essentielles des trois espèces de *T. algeriensis* (figure 84) ont les plus faibles capacités réductrices suivies par *T. numidicus* et *T. guyonii* (figure 85). L'absence ou la faible teneur en thymol et/carvacrol peut partiellement expliquer ce comportement pour 4 de ces échantillons (ALG2, ALG3, TNu, TGu). Les 5 échantillons de *T. pallescens* (figure 83) ont des capacités réductrices équivalentes et leurs compositions similaires pourraient être à l'origine de cette équivalence. *T. munbyanus* a une capacité réductrice similaire à celles des échantillons de *T. pallescens*, particulièrement celle de TP5. Les potentiels réducteurs du BHA, de l'acide ascorbique, du BHT et du tocopherol sont en accord avec celles rapportées dans la littérature (248, 249).

Les capacités réductrices des huiles essentielles des échantillons de l'origan de Chréa et d'Ouled Slama sont plus ou moins équivalentes entre elles et avec celles du BHT et du tocopherol pour les concentrations 600 - 1000 mg/L. Les échantillons de l'origan ont des pouvoirs réducteurs intermédiaires entre ceux de *T. pallescens* et ceux de *T. numidicus* et *T. guyonii*.

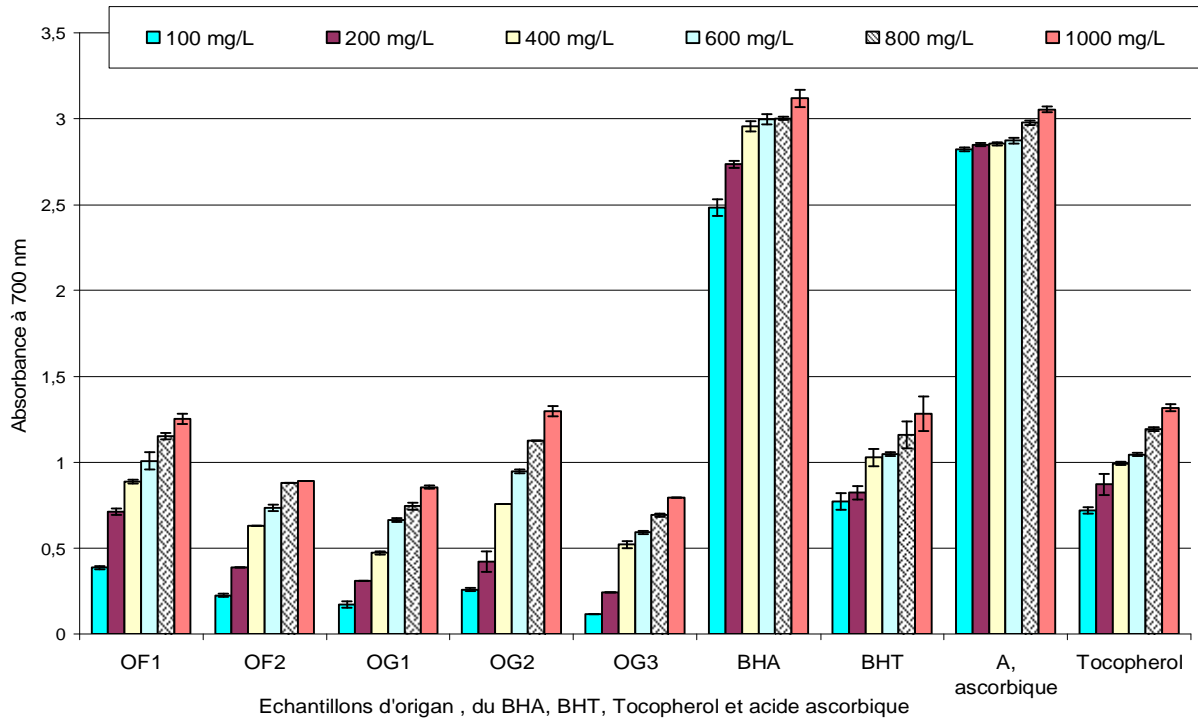


Figure 82 : pouvoir réducteur du BHA, BHT, tocopherol, acide ascorbique, des échantillons d'*Origanum floribudum* de Chréa (OF1), de Hammam Mélouane (OF2) et des échantillons d'*O. glandulosum* de Souhane (OG1), d'Ouled Slama (OG2) et d'Ighzer Amokrane (OG3)

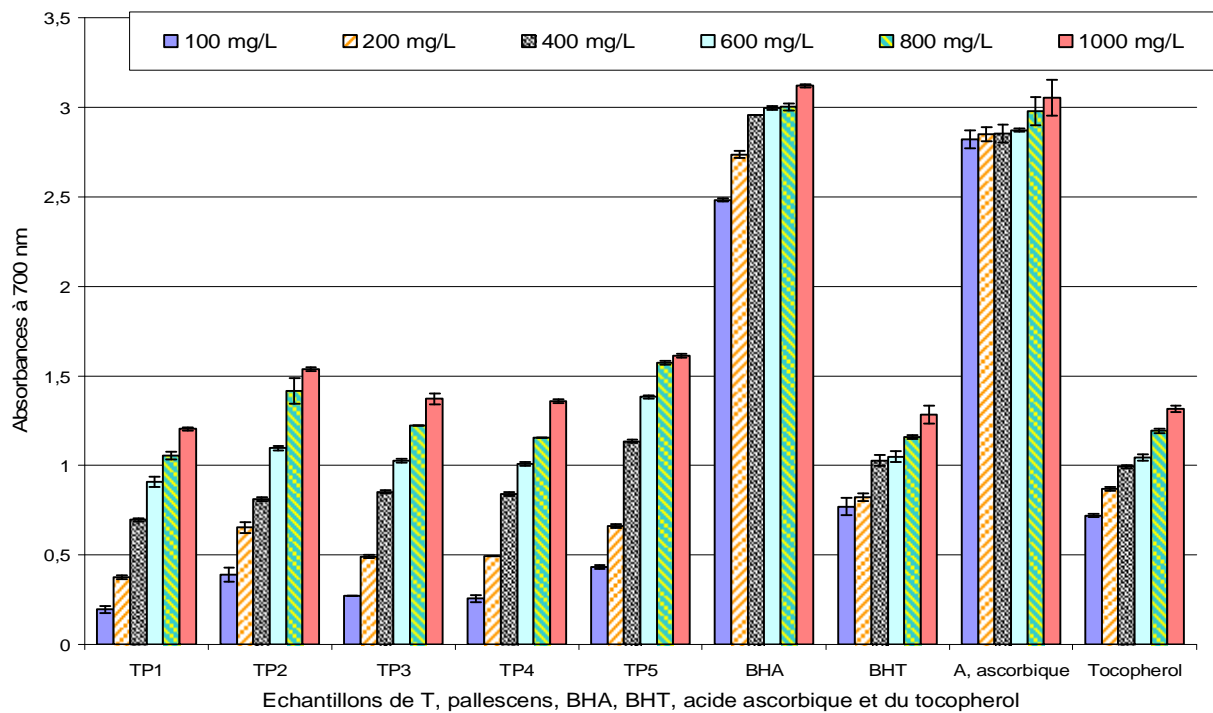


Figure 83 : Pouvoir réducteur du BHA, BHT, tocopherol, acide ascorbique et des échantillons de *T. pallescens* de Sidi Aissa (TP1), de Boussaâda (TP2), de Oued Rhiou (TP3), de Kadiria (TP4), et d'El Asnam (TP5)

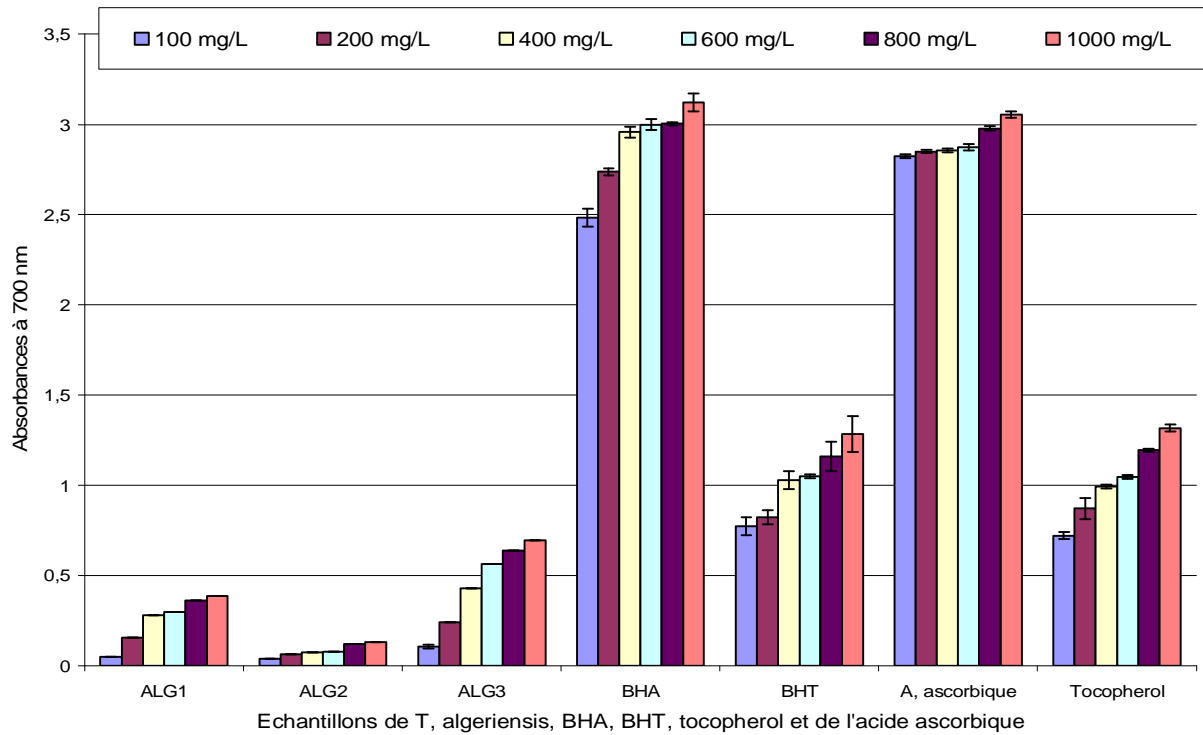


Figure 84 : Pouvoir réducteur du BHA, BHT, tocopherol, acide ascorbique et des échantillons de *T. algeriensis* de Chrea à 800m d'altitude (ALG1), de Chréa à 1500m d'altitude (ALG2) et d'El Asnam (ALG3)

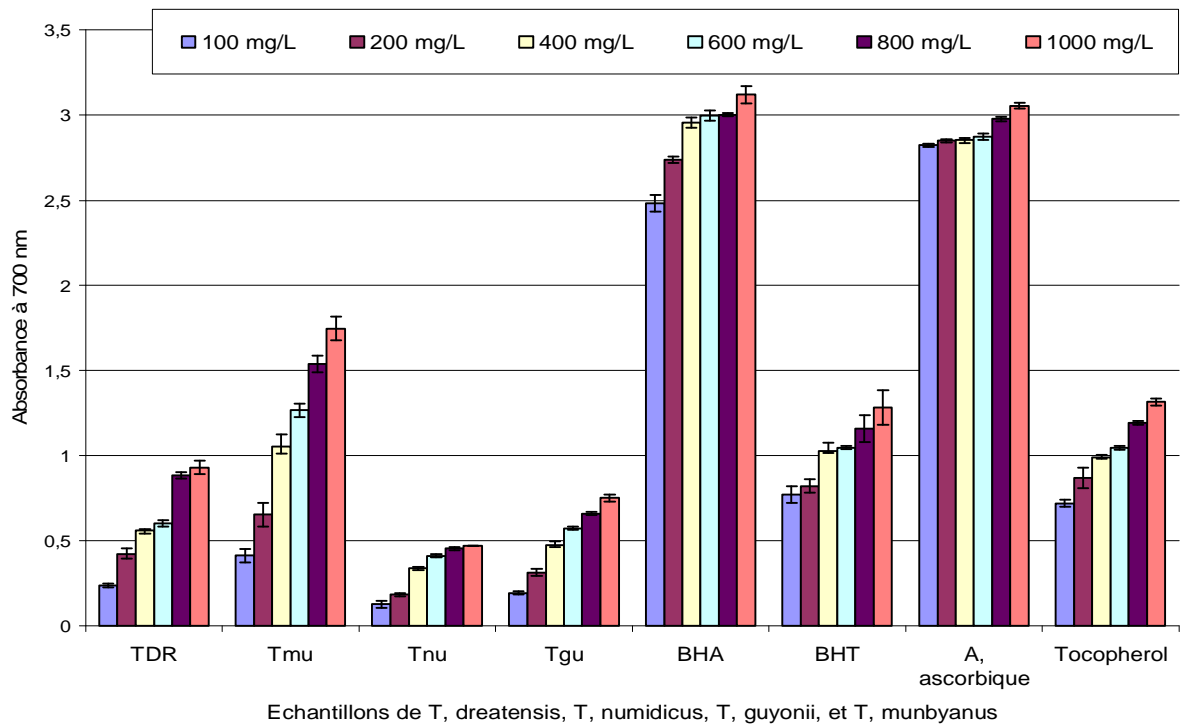


Figure 85 : Pouvoir réducteur du BHA, BHT, tocopherol, acide ascorbique et des échantillons de *T. dreatensis* (TDR), *T. numidicus* (TNu), *T. guyonii* (TGu) et de *T. munbyanus* (TMu)

- **Conclusion :**

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pour lesquels il est très difficile d'attribuer l'activité antioxydante à un ou plusieurs composés principaux. Tous les auteurs s'accordent à dire que les phénols jouent un rôle très important dans l'activité antioxydante des huiles essentielles, sans qu'ils soient les seuls responsables de cette activité. Nous avons vu que certaines huiles dont les compositions étaient similaires pouvaient avoir des activités parfois très différentes et imprévisibles. Ces différences ont été relevées dans plusieurs travaux rapportés dans la littérature et attribuées à des composés mineurs qui pourraient jouer un rôle de synergie prooxydante ou antioxydante. Mais de manière générale, nous avons vérifié que pour la majorité des tests de l'activité antioxydante, les huiles essentielles riches en phénols (thymol et/ou carvacrol) étaient souvent les plus actives.

6. Activité antimicrobienne

L'estimation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est basée sur une échelle de mesure mise en place par **Meena et Sethi** (250) et **Ela et al.**, (251). Ils ont classé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 04 classes :

1. Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28 mm ;
2. Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 16 et 28 mm ;
3. Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 10 et 16 mm ;
4. Non inhibitrice lorsque le diamètre d'inhibition est inférieur à 10 mm.

Selon cette échelle et les résultats des zones d'inhibitions des huiles testées sur les 7 souches bactériennes (tableau 44), l'huile essentielle de *Thymus palleescens* a une forte action inhibitrice sur les trois bactéries Gram – étudiées. L'huile essentielle de *Thymus dreatensis* a une action modérément inhibitrice sur les trois bactéries Gram – étudiées tandis que l'huile essentielle de *Thymus munbyanus* a une action modérément inhibitrice sur *Pseudomonas aeruginosa* et une forte action inhibitrice sur *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* et celle d'*Origanum floribundum* de Chréa a une forte action inhibitrice sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, et une action modérément inhibitrice sur *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae* s'est avérée la souche la plus sensible à l'action des huiles essentielles des trois espèces du thym, par contre *Escherichia coli* est la bactérie la plus résistante à l'action des huiles essentielles d'*Origanum floribundum* et de *T. dreatensis*. L'inhibition modérée de *T. dreatensis* par rapport aux autres échantillons peut s'expliquer par sa teneur plus faible en thymol et surtout en carvacrol auquel on attribue généralement une forte action inhibitrice (12, 107, 252-256).

Pour les bactéries Gram+, *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus faecium* ont été plus résistantes par rapport à toutes les huiles et particulièrement à celle de *T. dreatensis* qui a montré une action légèrement inhibitrice qui pourrait être partiellement due à sa faible teneur en thymol et/ carvacrol. *Staphylococcus aureus* a été la bactérie la plus sensible à toutes les huiles. La résistance plus marquée pour l'huile essentielle de *T. dreatensis* par les deux bactéries Gram + ainsi que la sensibilité à toutes les huiles par *Staphylococcus aureus* est illustrée par les photos des figures 86-88.

Selon **Nakatani** (274), les bactéries à Gram+ sont plus sensibles à l'action des huiles essentielles que les bactéries Gram- . **Chao et al.** (275) ont expliqué ce phénomène par le fait que les bactéries Gram- sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et une assise externe constituée de lipopolysaccharides et de protéines, cette dernière est absente chez les bactéries Gram+.

La structure des membranes des bactéries Gram- peut empêcher la prise d'huile et protéger la couche peptidoglycane vis-à-vis des huiles essentielles. Cependant, **Deans et Ritchie** (202) n'y trouvent pas de différence significative entre la sensibilité des bactéries Gram- et celles à Gram+, comme ce fut le cas de nos résultats.

En ce qui concerne la levure testée (*Candida albicans*), elle a été très sensible à l'action inhibitrice de toutes les huiles testées, à l'exception de celle de *T. dreatensis*, pour la raison principale précédemment avancée à savoir la pauvreté relative de cette huile en thymol et carvacrol.

Tableau 44 : Zones d'inhibition (mm±SD ; diamètre du disque=6mm, inclus)

Souches	<i>Thymus</i>	<i>Thymus</i>	<i>Thymus</i>	<i>O. floribundum</i>
	<i>pallenscens</i>	<i>dreatensis</i>	<i>munbyanus</i>	Chr�ea
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34,00± 1,00d	17,67 ± 0,58d	27,00 ± 1,00ef	33,00 ± 1,00b
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40,33 ± 0,58b	23,33 ± 1,53c	38,67 ± 1,15b	32,00 ± 1,00b
<i>Escherichia coli</i>	30,33 ± 0,58e	21,00 ± 1,00c	28,67 ± 1,15d	23,00 ± 1,00d
<i>Staphylococcus aureus</i>	49,67 ± 0,58a	33,00 ± 1,00a	43,67 ± 0,58a	42,33 ± 1,53a
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24,00 ± 1,00f	15, 33 ± 0,58de	24,00 ± 1,00g	22,33 ± 1,15c
<i>Enterococcus faecium</i>	23,33 ± 0,58f	14,67 ± 1,15e	25,00 ± 1,00fg	23,00 ± 1,00c
<i>Candida albicans</i>	37,67 ± 0,58c	27,67 ± 0,58b	35,00 ± 1,00c	31,33 ± 1,53b

Les valeurs dans chaque colonne avec des lettres diff erentes sont significativement diff erentes (P<0.05).

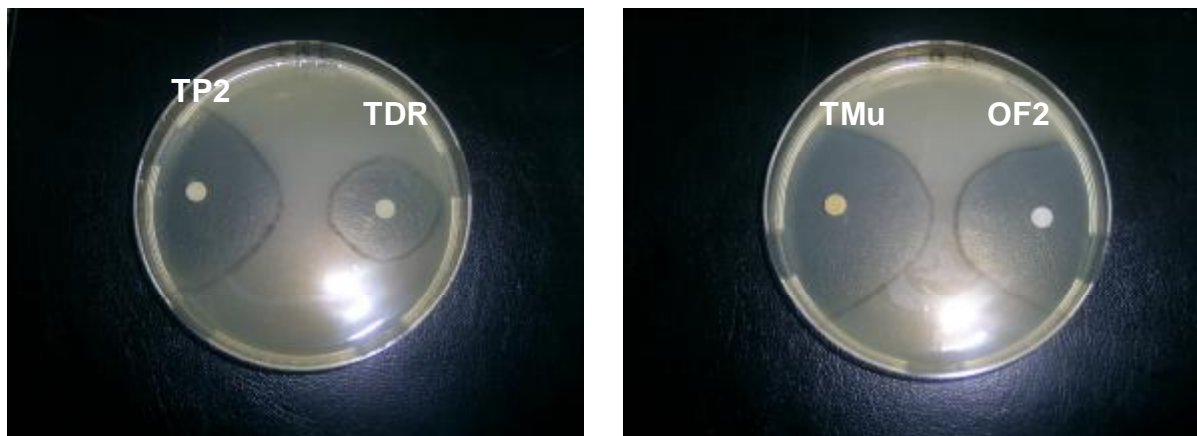


Figure 86 : Zone d'inhibition des huiles essentielles de *Thymus pallenscens*, *Thymus dreatensis*, *Thymus munbyanus* et *Origanum floribundum* sur *Staphylococcus aureus*

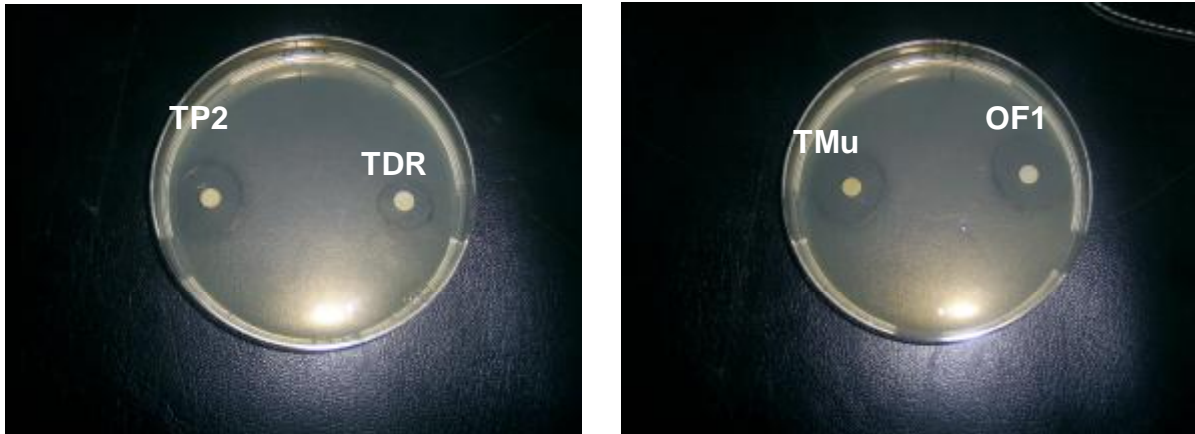


Figure 87 : Zones d'inhibitions des huiles essentielles de *Thymus pallescens*, *Thymus dreatensis*, *Thymus munbyanus* et de l'*Origanum floribundum* sur *Staphylococcus epidermidis*

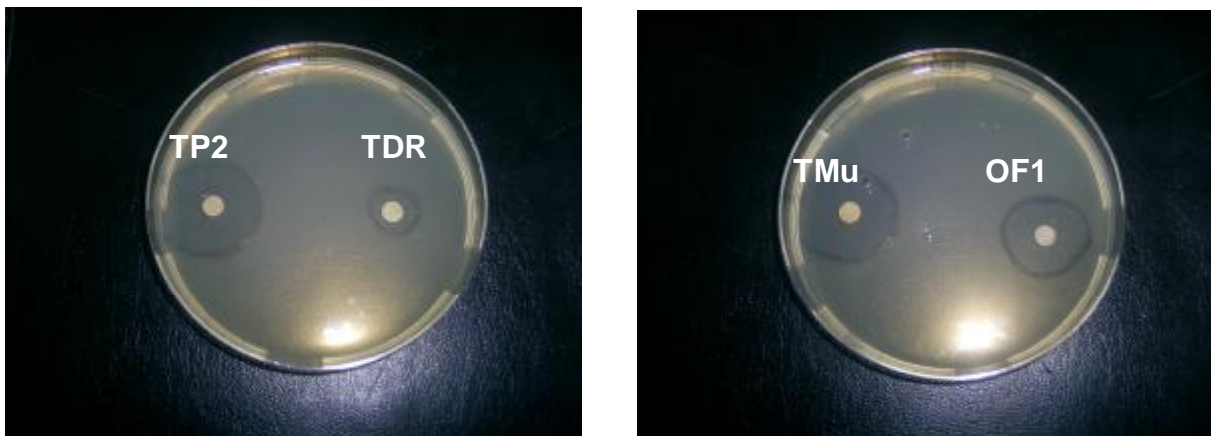


Figure 88 : Zone d'inhibition des huiles essentielles de *Thymus pallescens*(TP2), *Thymus dreatensis* (TDR), *Thymus munbyanus* (TMu) et d'*Origanum floribundum* (OF2) sur *Enterococcus faecium*

Listeria monocytogenes est une bactérie gram + responsable de la listériose qui est une maladie infectieuse des animaux et de l'homme, particulièrement grave chez la femme enceinte, le nouveau né et les personnes âgées. Parmi les complications de cette maladie on peut citer : l'avortement, la méningite, la naissance prématurée et un taux de mortalité de plus de 30% (261). *Listeria monocytogenes* est une bactérie pathogène des produits alimentaires qui a la capacité de croître dans un large intervalle de température (1-45°C), de pH 4.4-9.6 (pH optimum égal à 7.0), de teneur élevée en sel (100g/L en moyenne) et d'une activité de l'eau en dessous de 0.93 (262). *Listeria monocytogenes* est une bactérie ubiquitaire qui peut être trouvée dans l'eau, le sol, les fruits et légumes pourris (263). Cette bactérie a aussi été récupérée à différentes étapes du processus de fabrication de produits alimentaires (264). Elle a été impliquée dans la listériose humaine due à la consommation de végétaux bruts, de lait pasteurisé, de fromages (265) ainsi qu'à la consommation de poulet mal cuit (266).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de 5 échantillons d'origan (*Origanum glandulosum* de Souhane, Ouled Slama et Ighzer Amokrane et *Origanum floribundum* de Chréa et Hammam Mélouane) et de 4 espèces de thym (*T. munbyanus*, *T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. pallescens* de Tablat) (tableau 45) sur 13 souches

de *Listeria monocytogenes* montre que toutes les huiles essentielles ont produit des zones d'inhibitions qui varient de 6 à 14 mm. Ces résultats montrent une activité inhibitrice de toutes les huiles vis-à-vis de toutes les souches testées. Ces activités sont néanmoins significativement inférieures par rapport à celles de l'antibiotique utilisé comme témoin (le Chloramphenicol), ce qui signifie que les souches de *Listeria monocytogenes* ont manifesté une certaine résistance aux huiles essentielles des espèces de thym et d'origan testées (95c).

L'activité antilistériale des huiles essentielles d'espèces de thym d'Algérie et d'*O. floribundum* n'a à notre connaissance jamais été testée auparavant, par contre il existe une seule étude concernant un seul échantillon d'huile d'*O. glandulosum* de Sebdou (Tlemcen) (138). Cette étude dans laquelle 3 µL d'huile ont été utilisées, rapporte une zone d'inhibition de 16 mm pour une huile extraite par hydrodistillation et 20mm pour une huile extraite par micro-ondes. Une autre étude a testé 23 huiles essentielles d'*O. glandulosum* de différentes régions d'Algérie sur 6 autres bactéries (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*) (230). Cette dernière étude rapporte des zones d'inhibition variant entre 6 et 15 mm pour des disques imprégnés de **20 µL** de chaque huile essentielle. Donc, nos résultats pour *O. glandulosum* sont en accord avec ceux de la même espèce et étudiées dans des conditions assez proches des nôtres sur un certain nombre de bactéries.

Concernant les *Thymus*, nos résultats sont aussi en accord avec ceux rapportés par différents auteurs qui ont testé les huiles essentielles d'espèces de leurs pays sur *L. monocytogenes* (104). Par contre, d'autres auteurs ont rapporté des valeurs variant entre 18 et 34.75 mm de zones d'inhibition pour la même bactérie et les mêmes souches étudiées dans les mêmes conditions que les nôtres (107). Cette différence de comportement est difficile à corréler avec les compositions chimiques des huiles, bien que l'une des deux huiles essentielles utilisée par ces auteurs (*Thymus capitatus* L.) était constituée par 78.6% de carvacrol auquel il est souvent attribué une activité antimicrobienne très intense par rapport au thymol. Mais, la présence d'un taux aussi élevé de carvacrol ne peut pas être la seule explication puisque ces auteurs ont aussi utilisé l'huile essentielle d'origan (*Origanum vulgare* L.) contenant le thymol comme composé principal avec une teneur de 32.8% plus ou moins équivalente à celles de nos échantillons, et malgré cela ils trouvent des zones d'inhibitions variant entre 16.75 et 36.25 mm. Cette constatation suggère qu'un ou plusieurs autres composés ont exercé un effet synergique dans un sens ou dans un autre. Selon certains auteurs (257,258), le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles est en relation directe avec plusieurs paramètres tels que la nature des composés majoritaires et leurs concentrations, la nature et la structure des groupements fonctionnels et l'interaction probable entre les différents constituants (synergie).

Selon certains autres auteurs (15, 208), il est très difficile de faire une comparaison entre les résultats trouvés et ceux rapportés par la littérature, ceci peut être dû :

- A la nature du matériel végétal (l'espèce, extrait ou l'huile essentielle, origine géographique, altitude, saison de cueillette) ;
- Au procédé d'extraction ;
- A la composition chimique des huiles essentielles utilisées ;
- Au niveau de pureté du produit final et sa conservation ;
- A la nature des souches testées ;
- Aux méthodes utilisées pour estimer l'activité antimicrobienne ;

Tableau 45 : Activité antilisteriale des huiles essentielles de *Thymus* (*munbyanus*, *palleescens* de Tablat, *numidicus* et *guyonii*) et d'origan (mm, diamètre du disque = 6mm, inclus)

<i>L. monocytogenes</i>	<i>O. floribundun</i>		<i>O. glandulosum</i>			<i>Thymus</i>				Antibiotique
	Chrèa	Hamмам Mélouane	Ighzer Amokrane	Souhane	Ouled Slama	<i>T. munbyanus</i>	<i>T. palleescens</i> (Tablat)	<i>T. numidicus</i>	<i>T. guyonii</i>	
NCTC 7973	10.00±0.0 a	9.68±0.58a	9.67±0.58a	10.67±2.08a	11.67±2.08a	10.00±0.00a	9.67±2.08a	9.67±0.58a	9.33±0.58a	24.67±0.58b
Scott A	11.00±2.0bc	9.70±1.53bc	10.0±1.0bc	11.33±0.58c	10.00±0.0b	8.67±1.15ab	10.67±1.15bc	8.67±0.58ab	7.00±1.00a	28.00±1.73d
C681	11.67±1.53b	10.33±0.58b	12.00±0.0b	10.33±0.0b	7.33±1.15a	7.67±1.53a	8.00±2.00a	6.00±0.00a	7.33±1.15a	26.67±0.58c
C759	11.67±1.53bc	10.33±0.58 abc	11.33±1.15 abc	12.67±1.53c	8.67±0.58 abc	8.33±1.53 ab	8.33±1.15 ab	10.00±2.65abc	7.67±1.15 a	21.67±5.77d
C779	11.0±1.73a	10.00±3.0 a	10.67±1.15 a	11.33±3.06 a	12.00±2.65 a	9.33±3.21 a	12.33±2.52 a	9.33±0.58 a	12.33±2.52 a	27.67±0.58b
C782	10.0±0.00 a	9.67±0.58 a	12.67±2.52 a	11.33±1.53 a	8.00±1.00 a	9.33±0.58 a	11.67±2.89 a	8.67±1.53 a	9.33±1.15 a	20.00±5.0 b
C830	11.00±1.00 abc	9.67±0.58abc	10.0±1.00c	11.67±0.58bc	10.33±1.53 ab	9.33±0.58 abc	9.67±0.58 abc	8.00±1.00 ab	7.33±0.58a	26.33±2.31d
C882	10.00±1.00ab	9.33±0.58a	10.0±0.00ab	11.00±1.00b	10.33±0.58ab	9.67±0.58ab	9.67±0.58ab	9.67±0.58ab	9.00±1.00a	25.67±1.15c
C895	10.33±0.58bc	9.33±0.58ab	10.00±0.00bc	11.00±1.00cd	12.00±1.00d	14.00±1.73e	11.33±0.58cd	10.00±0.00bc	8.33±0.58a	25.33±0.58f
C897	11.67±0.58e	10.00±0.00abc	10.33±0.58cd	11.33±0.58de	10.0±1.00 bc	9.00±1.0b	11.0±0.0cde	8.00±0.00a	8.33±0.58a	27.00±0.00f
G14	11.00±1.00 a	11.67±3.06 a	9.33±0.58 a	12.67±0.58 a	11.67±2.89 a	11.0±1.00 a	10.33±0.58 a	10.33±0.58 a	11.00±2.65 a	24.67±4.51 b
SLU2157	10.33±0.58b	10.67±0.58b	10.67±0.58b	9.67±2.08b	9.67±1.15b	9.00±1.00ab	8.67±1.15ab	7.33±1.15a	7.33±1.15a	24.67±0.58c
SLU 1922	10.0±0.00ab	10.33±0.58b	9.00±0.00ab	10.0±0.00ab	9.33±0.58ab	9.0±0.00ab	10.00±0.00ab	8.67±0.58a	10.00±0.00ab	27.33±2.08c

Tableau 46 : Tableau récapitulatif des principales analyses effectuées

Plante	Espèce	Nombre d'échantillons	Provenance	Analyses effectuées
Origan	<i>O. glandulosum</i>	3	Souhane (Blida) Ouled Slama (Blida) Ighzer Amokrane (Béjaia)	- Composition chimique + Activité antioxydante + activité antimicrobienne sur 13 souches de <i>Listéria monocytogenes</i> .
	<i>O. floribundum</i>	3	Chrèa (Blida) à 1500 mètres d'altitude	- Composition chimique + Activité antioxydante + activité antimicrobienne sur 13 souches de <i>Listéria monocytogenes</i> + 7 autres souches bactériennes.
			Hammam Mélouane (Blida)	- Composition chimique + Activité antioxydante + activité antimicrobienne sur 13 souches de <i>Listéria monocytogenes</i> .
			Kadiria (Bouira)	- Composition chimique.
Thym	<i>T. munbyanus</i>	1	Ighzer Amokrane (Béjaia)	- Composition chimique + Activité antioxydante + activité antimicrobienne sur 13 souches de <i>Listéria monocytogenes</i> + 7 autres souches bactériennes
	<i>T. pallescens</i>	18	12 échantillons de Tablat (Médéa)	- Composition chimique.
			1 échantillon de Tablat	- Composition chimique + activité antioxydante + activité antimicrobienne sur 13 souches de <i>Listéria monocytogenes</i> .
			Kadiria (Bouira)	- Composition chimique + activité antioxydante
			Sidi Aissa (Djebel Kef Ennaga)	- Composition chimique + activité antioxydante
			Boussaada (Theniet eddem)	- Composition chimique + activité antioxydante+ activité antimicrobienne sur 7 souches bactériennes.
			El Asnam (Bouira)	- Composition chimique + activité antioxydante
			Oued Rhiou	- Composition chimique + activité antioxydante
<i>T. algeriensis</i>	4	El Asnam (Bouira)	- Composition chimique+ activité antioxydante	

		Chr�ea (Blida) � 800m d'altitude	- Composition chimique + activité antioxydante
		Chr�ea (Blida) 1500 mètres d'altitude	- Composition chimique + activité antioxydante
		Tazmalt (Tizi Ouzou)	- Composition chimique + activité antioxydante
<i>T. numidicus</i>	2	Yakouren (Tizi Ouzou)	- Composition chimique + activité antioxydante + activité antimicrobienne sur 13 souches de <i>Listeria monocytogenes</i> .
		Yakouren (Tizi Ouzou)	- Composition chimique
<i>T. guyonii</i>	1	Djebel Haoues (Djelfa)	- Composition chimique + activité antioxydante + activité antimicrobienne sur 13 souches de <i>Listeria monocytogenes</i> .
<i>T. dr�aternsis</i>	1	Takoucht (Bouzeguene -Tizi Ouzou)	- Composition chimique + activité antioxydante + activité antimicrobienne sur 7 souches microbiennes.

Conclusion générale

Conclusion générale

La flore Algérienne possède de nombreuses plantes aromatiques et médicinales ; quelques unes sont très répandues et abondantes telles que certaines espèces de thym et d'origan.

La détermination de la composition chimique d'une huile essentielle, la mise en évidence d'une éventuelle spécificité ou le contrôle de sa qualité, sont des étapes importantes qui nécessitent l'utilisation de différentes méthodes d'analyse.

Dans la première partie de notre travail nous nous sommes intéressés à l'extraction et à la caractérisation par chromatographie en phase gazeuse seule et par CG/SM des huiles essentielles de 33 échantillons appartenant à six espèces de thym et deux espèces d'origan poussant en Algérie, à savoir *T. algeriensis*, *T. pallescens*, *T. numidicus*, *T. munbyanus*, *T. dreatensis* et *T. guyonii* pour le thym et *O. glandulosum* et *O. floribundum* pour l'origan. Les espèces *T. pallescens*, *T. munbyanus*, *T. dreatensis* et *T. guyonii* sont étudiées pour la première fois.

L'observation au microscope photonique, des coupes histologiques des tiges et des feuilles du thym et de l'origan a révélé la présence de poils sécréteurs, tecteurs et glandulaires.

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation a fourni des rendements variant entre 0.4% (mL/100g de matière fraîche) pour *T. algeriensis* et 6.2% pour *T. pallescens* de Oued Rhiou et entre 1.8% pour *O. glandulosum* de Béjaïa et 4.5% pour *O. floribundum* de Chréa. Si l'on excepte *T. algeriensis*, ces rendements classent le thym et l'origan d'Algérie parmi les espèces riches en huiles essentielles.

Pour les quatre échantillons de *Thymus algeriensis*, nous avons constaté une grande variabilité chimique des huiles essentielles de cette espèce, même pour des échantillons issus d'un même lieu et des positions différentes. Ainsi, nous avons déterminé quatre chémotypes différents pour cette espèce dont trois sont décrits pour la première fois et caractérisés par une prédominance combinée du geranyle acetate (16,4%), du caryophyllène oxide (5%), du β -caryophyllène (3,6%) et du β -myrcène (3,1%) pour *T. algeriensis* de Tazmalt ; du terpinyl acetate (18,0%), du nerolidol (12,6%), de l' α -pinène (11,1%), du borneol (9,0%) et du bornyl acetate (7,7%) pour l'échantillon de Chréa récolté à 1500 mètre d'altitude et du 4-terpèneol (10,6%), du camphre (10,1%), du p-cymène (9,9%), du 1-8-cinéole (6,5%) et de l' α -pinène (6,5%) pour l'échantillon d'El-Asnam.

A l'opposé du polymorphisme chimique de *T. algeriensis*, pour six échantillons de *Thymus pallescens* récoltés dans différentes régions (Sidi Aïssa, Boussaâda, Oued Rhiou, Kadiria, El Asnam et Tablat) nous avons constaté une grande stabilité chimique de l'huile essentielle de cette espèce qui est la plus répandue, la plus abondante et dont les rendements sont les plus élevés (2.7-6.2%). Ainsi, cinq des six échantillons ont le carvacrol (41.5-50.9%), le p-cymène (10.0-17.3%) et le γ -terpinène (10.8-16.6%) comme composés principaux et un seul échantillon issu de Oued Rhiou contient le thymol (49.3%) comme constituant majoritaire suivi par le p-cymène (11.2%) et le γ -terpinène (10.9%).

La stabilité de cette espèce s'est manifestée une fois de plus lors de son étude qui s'est étendue sur quatre années successives (2003-2006) pour trois stades végétatifs. Cette étude a montré que la période de floraison fournit pour chaque année le meilleur rendement en huile essentielle (4.2-4.6%), une composition plus ou moins stable caractérisée par des valeurs moyennes de 11.6, 14.2 et 49.1% pour le p-cymène, le γ -terpinène et le carvacrol, respectivement, ainsi que des teneurs assez proches en monoterpènes et en sesquiterpènes avec des valeurs moyennes de 92.6% et 3.6%, respectivement. Le rendement élevé en huile essentielle, la large

répartition, l'abondance, la stabilité relative de l'huile essentielle de cette espèce ainsi que sa teneur appréciable en carvacrol sont des facteurs favorables pour une éventuelle exploitation industrielle.

L'extraction des huiles essentielles, séparément des feuilles et des fleurs de *T. pallescens* de Kadiria a montré une légère différence entre les rendements des feuilles (2,8%) et des fleurs (3,7%). Les deux parties de la plante ont les mêmes constituants qui diffèrent par leurs teneurs. Les principaux composés des feuilles et des fleurs sont le p-cymène (17,4% vs 9,2%), le γ -terpinène (10,6% vs 14,1%) et le carvacrol (39,0 % vs 48,3%), respectivement. Donc, les fleurs sont plus riches en γ -terpinène et en carvacrol tandis que le p-cymène est concentré dans les feuilles. Les sesquiterpènes et les sesquiterpènes oxygénés sont plus importants dans les feuilles que dans les fleurs.

T. numidicus est une plante qui pousse dans le constantinois et en Kabylie. Les deux échantillons récoltés de Yakourene (Kabylie) ont fourni deux huiles essentielles chimiquement différentes dont l'une est caractérisée par le linalool (5,6%), le p-cymène (8,0%), et le carvacrol (28,1%) et l'autre par le p-cymène (6,7%), le carvacrol (6,8%), le γ -terpinène (8,4%), le thymol (15,4%), et l' α -terpineol (34,4%) comme composés majoritaires. Ceux sont deux nouveaux chémotypes de cette espèce dont les études antérieures relatives à des échantillons du constantinois rapportent un seul chémotype caractérisé par le thymol (60,8-68,2%) (97, 106). En outre, les espèces ou variétés de thym connues à ce jour et caractérisées par l' α -terpineol comme composé le plus important sont peu nombreuses.

La composition chimique de *T. munbyanus* est caractérisée par le thymol (37,7%) suivi par le p-cymène (14,2%), le γ -terpinène (10,2%) et le carvacrol (8,4%). C'est un profil de composition que l'on retrouve très souvent dans les huiles essentielles du genre *Thymus*.

T. dreatensis se distingue des autres espèces étudiées par sa teneur la plus élevée en monoterpènes oxygénés (76,3%) représentés dans leur quasi-totalité (70,2%) par le linalool (30,4%), le géraniol (19,6%) et le thymol (20,2%). Ce taux élevé du géraniol dans l'huile essentielle de cette espèce est très remarquable dans la mesure où ce composé n'a jamais été détecté auparavant dans les huiles essentielles des espèces de thym d'Algérie, même à l'état de traces.

Les principaux composés de *T. guyonii* sont le p-cymène (18,6%), le γ -terpinène (13,0%), le thymol (10,9%) et le méthyl thymol (10,7%). C'est la première espèce de thym poussant en Algérie à être caractérisée par le p-cymène comme composé le plus important. Sa teneur élevée en méthyl thymol (10,7%) équivalente à celle du thymol (10,9%) lui confère une spécificité par rapport à tous les *Thymus* connus à ce jour et ayant dans leur composition le p-cymène comme composé le plus important.

O. glandulosum est l'espèce d'origan la plus répandue et la plus abondante en Algérie. Elle a été la plus étudiée. Les compositions chimiques des trois échantillons étudiés se caractérisent par le p-cymène (16,8-23,0%), le γ -terpinène (11,5-23,9%) et le thymol (23,9-36,0%) comme principaux constituants. Ce résultat est en accord avec la majorité des échantillons d'autres régions et étudiés par différents auteurs (108, 135, 230, 231). Par contre, les huiles essentielles de deux échantillons d'*O. floribundum* sont caractérisés par le p-cymène (15,5-24,9%), le γ -terpinène (19,9-22,3%) et le thymol (27,3-33,6%) tandis qu'un seul échantillon issu de Chréa contient le carvacrol (29,6%) comme composé le plus important suivi par le p-cymène (18,3%) et le γ -terpinène (13,7%). La composition ayant le thymol comme constituant majoritaire est ici reportée pour la première fois (95c). En outre, le chémotype à thymol semble même être le plus fréquent.

Une large différence entre les rendements en huiles essentielles des fleurs (5,4%) et des feuilles (2,0%) de l'espèce *O. floribundum* de Kadiria a été obtenue. Une différence notable entre les huiles des deux parties de la plante est la concentration du p-cymène et des sesquiterpènes dans les feuilles tandis que le γ -terpinène et le thymol sont plus importants dans les fleurs.

Dans la deuxième partie, nous avons testé *in vitro* 18 échantillons pour leur possible activité antioxydante par quatre tests différents : l'inhibition du radical DPPH[•], du radical hydroxyle (OH[•]), de la peroxydation des lipides par la réaction avec le TBA ou TBARS et le pouvoir réducteur. L'activité de piégeage du radical DPPH[•] exprimée en terme de concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC₅₀) des échantillons d'origan est en accord avec les résultats rapportés par d'autres auteurs sur l'origan d'Algérie (230). *O. glandulosum* d'Ouled Slama a été le plus actif avec une activité équivalente à celle du BHT (378.2mg/L pour une réaction d'une durée de 5 min).

Parmi les espèces de thym : *T. numidicus*, *T. mubyanus*, *T. guyonii* et *T. pallescens* de Tablat ; l'huile essentielle de *T. pallescens* a été la plus active dans l'inhibition du radical DPPH[•] (IC₅₀=410.2 mg/L proche de celle du BHT pour une réaction de 5 minutes). *T. guyonii* qui est le plus pauvre en thymol et/ou carvacrol a été le moins actif.

Le test de l'activité de piégeage du radical DPPH[•] pour une réaction de 20 minutes de trois échantillons de *T. algeriensis*, de 5 échantillons de *T. pallescens* de différentes régions et d'un échantillon de *T. dreantensis* montre une très faible capacité inhibitrice des deux nouveaux chémotypes de *T. algeriensis* due probablement à l'absence de thymol et/ou carvacrol de la composition chimique de ces échantillons. *T. pallescens* de Sidi Aissa a émergé du lot des échantillons de son espèce en exhibant une activité inhibitrice égale à celles du BHA et du BHT aux concentrations élevées (800 et 1000 mg/L). Tous les autres échantillons ont des capacités plus ou moins équivalentes sur toute l'étendue de l'intervalle des concentrations (100-1000mg/L).

Le séparation de l'huile essentielle de Boussaâda en deux fractions a permis d'obtenir, pour une concentration en huile essentielle de 100 mg/L, de la fraction riche en carvacrol (81.4%) une activité équivalente à celles de 600-1000 mg/L de l'huile essentielle dont elle est issue, ce qui témoigne que le carvacrol joue un rôle important dans l'activité inhibitrice du radical DPPH.

L'activité antioxydante des échantillons des huiles essentielles d'origan évaluée par le test de réaction avec les substances réactives au TBA (TBARS) a fourni en l'absence de l'initiateur de radicaux libres (ABAP), des activités comparables ou supérieures à celles des antioxydants de synthèse (BHA, BHT, tocophérol) pour les concentrations variant entre 250 et 1000 mg/L (95c). *O. floribundum* contenant le carvacrol comme composé principal a montré une activité accrue par rapport aux autres échantillons sur tout l'intervalle des concentrations testées. En présence de l'ABAP, une diminution des activités est observée. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés par d'autres auteurs pour *O. glandulosum* de Sétif (135).

Les huiles essentielles des espèces : *T. munbyanus*, *T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. pallescens* de Tablat, particulièrement celles de *T. munbyanus* et *T. pallescens* ont montré, en l'absence de l'ABAP, de grandes capacités d'inhibition de la peroxydation des lipides. En présence de l'ABAP, toutes les huiles essentielles ont enregistré des diminutions de leurs activités particulièrement pour les faibles concentrations (50 et 100mg/L). L'espèce la plus pauvre en thymol et carvacrol (*T. guyonii*) a enregistré les diminutions les plus significatives (95c).

L'activité d'inhibition de la peroxydation des lipides en présence de l'ABAP exprimée en terme de IC_{50} , par les huiles essentielles de *T. pallescens* (de Sidi Aissa, Boussaâda, Oued Rhiou, Kadiria et El Asnam), de *T. dreatensis* et de *T. algeriensis* de Chréa (800 et 1500 m d'altitude) et d'El Asnam montre des disparités entre les échantillons d'une même espèce et appartenant au même chémotype à carvacrol. Les huiles essentielles de *T. algeriensis* ont varié entre très active (échantillon de Chréa 800 m d'altitude) et inactive (échantillon de Chréa 1500 m d'altitude). L'absence de thymol et de carvacrol du second échantillon cité peut expliquer partiellement son inactivité.

L'inhibition du radical hydroxyle par les huiles essentielles des échantillons de l'origan a varié entre IC_{50} = 7.5 mg/L pour l'origan d'ouled Slama et 100.2 mg/L pour l'origan de Souhane. Par contre pour les *Thymus*, la concentration inhibitrice IC_{50} a varié entre 1.07 mg/L pour *T. numidicus* et 24.0 pour *T. guyonii*. De manière générale les échantillons de thym et d'origan ont été de bons inhibiteurs du radical hydroxyle, mais il est très difficile de trouver une corrélation entre les compositions chimiques ou les principaux composés et l'activité inhibitrice des radicaux hydroxyles. Toutefois, il y a lieu de remarquer la grande capacité inhibitrice de ce radical par les échantillons de *T. algeriensis* pauvres en thymol et carvacrol.

Les huiles essentielles de thym pauvres en thymol et carvacrol (*T. algeriensis* de Chréa et d'El Asnam, *T. guyonii* et *T. numidicus*) ont montré des pouvoirs réducteur assez faibles. Le *T. munbyanus* a un pouvoir réducteur relativement plus élevé par rapport à tous les autres échantillons de thym et d'origan et des témoins positifs BHA et BHT pour les concentrations 500-1000 mg/L. De manière générale les huiles essentielles de thym et d'origan riches en thymol et/ou carvacrol ont des pouvoirs réducteurs plus ou moins équivalents entre eux et à ceux du BHA et BHT, particulièrement pour les concentrations 500-1000 mg/L.

Quatre échantillons d'huiles essentielles (*T. munbyanus*, *T. pallescens* de Boussaâda, *T. dreatensis* et *O. floribundum* de Chréa) ont été testés sur 7 bactéries (3 Gram -, 3 Gram + et une levure) pour leur activité antimicrobienne. Les souches microbiennes Gram +, *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus faecium* ont été les moins sensibles à l'action inhibitrice de toutes les huiles essentielles. Par contre, *Staphylococcus aureus* a été la plus sensible à l'action inhibitrice de toutes les huiles, suivie par *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans*. Pour les huiles essentielles, celle de *T. pallescens* a été la plus active tandis que celle de *T. dreatensis* la moins active.

Neuf échantillons d'huiles essentielles ont été testés sur 13 souches de *Listeria monocytogenes*. Les résultats obtenus montrent une résistance de cette bactérie à l'action inhibitrice de toutes les huiles essentielles testées par rapport à l'antibiotique (Chloramphénicol) (95c).

L'étude détaillée des huiles essentielles en général, reste un travail de longue haleine. Il peut être constamment amélioré par les techniques d'extraction, de séparation et d'identification et reste lié au fait que la composition de ces essences dépend énormément de divers facteurs dont l'environnement pédoclimatique, les facteurs génétiques, l'âge de la plante et les quantités relatives des parties traitées de la plante.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- (1) Bouhdid S. ; Idaomar M.; Zhiri A.; Baudoux D.; Skali N.S. Abrini J. *Thymus* essential oil : chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities. Congrès International de Biochimie, Agadir, Maroc, 09-12 Mai 2006.
- (2) Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier, 2^{ème} Ed., Paris. 623p. 1999. (Techniques et Documentation).
- (3) Frankel E.N. In : Lipid oxidation. E.N. Frankel Ed. The oily press ltd, Dundee, 303 p. 1998.
- (4) Cosgrove J.P.; Church, D. F.; Prior W. A. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 1987, 22, 299-304.
- (5) Friedman M.; Henika P.R.; Mandrell R.E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Camphylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 2002, 65, 1545-1560.
- (6) Odoul M. Les huiles essentielles. La lettre de l'Institut Français de Shiatsu. 2003, n. 2, p. 1-12.
- (7) Berthier A. Epices-Aromates : Leurs huiles essentielles et oléorésines. Parfums, cosmétiques, arômes. 1980. n. 34, P. 39-44.
- (8) Valnet, J. Aromathérapie : Traitement des maladies par les essences des plantes. Ed. Maloine, Paris. 1980, 542 p.
- (9) Naves Y.R. Qu'est qu'une huile essentielle ? Ed. Masson, Paris. 1974.
- (10) Belaiche P. "L'aromatogramme". Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. M. S. A. Editeur. Paris. 1979, tome 1, 204p.
- (11) Bernard T. ; Perinau. F.; Brav O.; Delmas M.; Gaset A. Extraction des huiles essentielles : Chimie et technologie. *Information chimie*. 1988, 298, 179-184.
- (12) Conner, D. E. Naturally occurring compounds. In Davidson P. M. and Branen A.L. Antimicrobials in foods, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 1993, 468 p.
- (13) AFNOR. Association française de normalisation. Normes françaises : huiles essentielles. Ed. AFNOR, 2000, Paris.
- (14) Girod-Quillain I. ; Grundschober F. Les arômes alimentaires: réalités et perspectives. *Ind. Alim. Agr.* Juin 1998, 72-79.
- (15) Pibiri M.C. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doc., Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse, 2006, 177p.
- (16) Marotti M.; Picaglia R.; Giovanell, E. Differences in essential oils composition of basil (*Ocimum basilicum L.*) Italian cultivars related to morphological characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44 , 3926-3929.
- (17) Trierweiler R. Huiles : Douceurs et plantes à parfums, Edisud , 1994.
- (18) Makhoulouf H. Les huiles essentielles du romarin et du clou de girofle : Approche analytique et activité antioxydante sur une huile alimentaire. Mémoire Ingénieur, INA, El-Harrach- Alger, 2002.
- (19) Richard H.; Multon J.L. Les aromes alimentaires. Ed. Lavoisier, Paris, 1992, 438 p. (Sciences et techniques agroalimentaires).
- (20) Guignard J.L. Biochimie végétale. Ed. Masson, Paris. 1996, 255 p.

-
- (21) Franchomme P., Penoël D. et al. Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique : matière, énergie, information. In *L'aromathérapie exactement*, R.J. Editeur, Limoges, 2, 73-227. 1990.
- (22) Mailhebiau P. La nouvelle aromathérapie : biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. 1994, Lausanne, 635p.
- (23) Inouye S., Takizwa T., Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. antimicrobial aromatherapy*, 47, 565-573, 2003.
- (24) Sirovopoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C, Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Food Chemistry*. 1996, 44, 1202,1205.
- (25) Anonyme. huile essentielle : Principales propriétés et caractéristiques. www.penntybio.com/huile, 2007.
- (26) Mayer G.B. Produits PFI-CO₂, une nouvelle génération de produits pour l'alimentation extraits au Co₂, *Industries Agro-Alimentaires*. 1989, 847-853.
- (27) Pellerin P. Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 2001,954 (14), 51-62.
- (28) Garnerio J. Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur. 1996, 1-45.
- (29) Blakeway J., Salerno M. Pour la science, Institut des renseignements scientifiques et Techniques, 1987, Paris.
- (30) Silverstein R. M., Bassler G. C., Morill T. C. Spectroscopic Identification of Organic Compounds, 5th edition, John Wiley & Sons, New York, 1991.
- (31) Cooper J. W. Spectroscopic Techniques for Chemistry Research, John Wiley & Sons, New York, 1980.
- (32) Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris, 1995.
- (33) Longevialle P. Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris, 3-14 et 83-89, 1981.
- (34) Constantin E. Spectrométrie de masse, Lavoisier, Tec & Doc, 1-14, Paris, 1996.
- (35) De Hoffman E., Chrette j., Stroobant V. Spectrométrie de masse, 2^e édition, Librairie Dunod, Paris, 1999.
- (36) McLafferty F. W., Turecek F. Interpretation of mass spectra. Fourth edition, University Science Books, Saussalito, California, 1993.
- (37) Joulain D., König WA. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. E. B.-Verlag, Hambourg, 1998.
- (38) Adams R. P. Identification of Essential Oil Components by Ion Trap Mass Spectroscopy, Academic Press, Inc., San Diego, 1989.
- (39) Adams R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 1995.
- (40) McLafferty F. W., Stauffer D. B. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 1-7, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, 1989.
- (41) Joulain D., Laurent A. Two closely Related Sesquiterpenols: 1-endoboubonanol and 1,6-Germacradien-5-ol. *J. Essent. Oil Res.*, 1, 299, 301, 1989.

- (42) Schultze W., Lange G., Shmaus G. Isobutane an Ammonia Chemical Ionisation Mass Spectrometry of Sesquiterpene Hydrocarbons, *Flavour Fragr. J.* 1992, 7, 55-64.
- (43) Vernin G., Petitjean M., Poile J. C., Metzger J., Fraisse D., Suon K.N. Mass Spectra and Kovats Indices Databank of Volatile Aroma Compounds, Chap. VII in *Computer Aids to Chemistry*, Vernin G. and Chanon M. ed., Horwood E., Pub., Chilchester, 1986, 294-233.
- (44) Vernin G., Metzger J., Suon K.N., Fraisse D., Ghiglione C., Hamoud A., Pàrkànyi C. GC-MS-SPECMA Bank Analysis of essential oils and Aromas. GC-MS (EI-PCI) Data Bank Analysis of Sesquiterpenic Compounds in Juniper Needle Oil- Application of the Mass Fragmentometry SIM Technique, *Lebensm.-Wiss.u. Technol.*, 1990, 23, 25-33.
- (45) Cavaleiro C. Oleos essenciais de *Juniperus* de Portugal, Thèse de Doctorat, Univ. Coimbra, Portugal, 2001.
- (46) Harrison A. G. Chemical Ionisation Mass Spectrometry, 2nd Edition, CRC, Boca Raton, Florida, 1992.
- (47) De Hoffman E., Charrette J., Stroobant V. Spectrométrie de masse, 2^{ème} édition, Librairie Dunod, Paris, 1999.
- (48) Lange G., Schultze W. Studies on Terpenoid and Non-Terpenoid Esters using Chemical Ionisation Mass Spectrometry in GC/SM Coupling, in *Bioflavour'87*, chreir P. Ed., de Gruyter W. & Co., Berlin, New York, 1988, 105-114.
- (49) Badjah Hadj Ahmed A.Y., Meklati B. Y., Fraise D. Mass Spectrometry with Positive Chemical Ionisation of Some α -Pinène and β -Pinène Derivatives, *Flavour Fragr. J.*, 1988, 3, 13-18.
- (50) Zupane M., Prosèk M, Dusan M. Combined CI and EI mass spectra in the analysis of essential oils. *J. high Resol. Chromatogr.* 1992, 15, 510-513.
- (51) Cambon A. La spectrométrie de masse multidimensionnelle et ses applications à l'analyse des mélanges complexes, *Science, Technique, Technologie*, 1989, 11, 4-10.
- (52) Yost R.A., Enke C.G. Triple quadrupole spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation. *Anal. Chem.* 1979 51, 1251-1264.
- (53) Joulain D. Method for analysing essential oil. Modern analysis methodologies: Use and abuse, *Perfum. Flavor.* 1994. 19, 5-17.
- (54) Le Quéré J. L. le couplage CPG/IRTF dans l'analyse des arômes, *Analysis*, 1992, 20(2), 46-49.
- (55) Wilkins C. L. Multidimensional GC for qualitative IR and MS of mixtures. *Analytical Chemistry*, 1994, 66, 295-301.
- (56) Hedges L. M., Wilkins C. L. Component Analysis of *Eucalyptus* Oil by Gas Chromatography- Fourier Transform-Infrared Spectrometry-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.*, 1991, 29, 345-350.
- (57) Krock K. A., Raganathan N., Wilkins C. L. Multidimensional Gas Chromatography Coupled With Infrared and Mass Spectrometry for Analysis of *Eucalyptus* Essential oils, *Anal. Chem.*, 1994, 66, 425-430.
- (58) Cremin P., Donnelly D. M. X., Wolfender J. -L., Hostettmann K. Liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric analysis of sesquiterpenes of *Armillaria* (Eumycota: Basidimycotina) species, *J. Chromatogr. A*, 1995, 710, 273-285.
- (59) Wolfender J. -L., Hostettmann K. Importance of LC/Ms in plant analysis, *Spectrometry Europe*, 1996, 8, 7-12.

- (60) Mondello L., Dugo P., Bartle K.D. Automated HPLC-HRGC: A Powerful Method for Essential Oil Analysis. Part V. Identification of Terpene Hydrocarbons of Bergamot, Lemon, Mandarin, Sweet Orange, Bitter Orange, Grapefruit, Clementine and Mexican Lime Oils by Coupled HPLC-HRGC-MS (ITD), *Flavour Fragr. J.* 1995, 10, 33-42.
- (61) Munari F., Dugo G., Cotroneo A. Automated On-line HPLC-HRGC with Gradient Elution and Multiple GC Transfer Applied to the Characterization of *Citrus* Essential Oils, *J. High Resol. Chromatog.* 1990, 13, 56-61.
- (62) Korhammer S. A., Berreuther A. Hyphenation of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Other Chromatographic Techniques (SFC, GPC, GC, CE) with Nuclear Magnetic Resonance (NMR)! A review, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 354, 131-135.
- (63) Albert K., Schlotterbeek G., Tseng L.,-H., Braumann U. Application of online Capillary High-Performance Liquid Chromatography – Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry Coupling for the Analysis of Vitamin A derivatives, *J. Chromatogr. A.* 1996, 750, 303-309.
- (64) Grundschober F. The identification of individual components in flavourings and flavoured foods, *Z. Lebensm Unters Forsch.* 1991, 192, 530-534.
- (65) Tomi F., Bradesi P., Brighelli A., Casanova J. Computer-Aided Identification of Individual Components of Essential Oils using Carbon-13 NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson. Anal.*, 1995,1, 25-34.
- (66) Tomi F., Casanova J. Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles, *Annals Fals. & Expertise Chim.* 2000, 93, 313-330.
- (67) Castola V., Bighelli A., Casanova J. Direct Qualitative and Quantitative Analysis of Triterpènes Using ¹³C NMR Spectroscopy Exemplified by Dichloromethanic Extracts of Cork, *Applied Spectroscopy*, 1999, 53, 344-350.
- (68) Castola V., Bighelli A., Conti L., Scano G., Mascia S., Casanova J. Identification and Quantification Of Anhydrosugars in Biomass Pyrolytic Oils Using Carbon-13 NMR spectroscopy, *Canadian J. Analytical Sciences and Spectroscopy*, 2000, 45, 102-107.
- (69) Mazzoni V., Bradesi P., Tomi F., Casanova J. Direct Qualitative and Quantitative Analysis of Carbohydrates Mixtures Using ¹³C NMR Spectroscopy : Application to Honeys, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 1997, 35, 81-90.
- (70) Morales R. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In *Thyme: the genus Thymus. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles*; Stahl-Biskup, E.; Saez, F., Eds.; Taylor & Francis (Vol.17). London, 2002.
- (71) Richard H., Benjlali B., Bauquour N., Baritoux O. Etude de diverses huiles essentielles de thym du Maroc. *Lebensm-Wiss U-Technol.* 1985.
- (72) Mességué M. Mon herbier de santé. Ed. Robert Laffont, Paris, 1975, 333p.
- (73) Quezel P.; Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques. CNRS: Paris, 1963.
- (74) Dorman H.J.D., Bachmayer O., Kosar M., Hiltunen R. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Limiaceae species grown in Turkey. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 762-770.
- (75) Jalas J., 1971. Note of *Thymus* L. (Labiatae) in Europe.1. Supraspecific classification and nomenclature. *Bot. J. Linn. Soc.*, vol. 64, P. 199-215.

- (76) Stahl-Biskup, E. Essential oil chemistry of the genus *Thymus* - A global view. In *Thyme: the genus thymus. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles*; Stahl-Biskup, E.; Saez, F. Eds.; Taylor & Francis (Vol.17). London, 2002.
- (77) Haraguchi H., Saito T., Ishikawa, Date H., Katakoa S., Tamura Y., Mizutani K. Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*, *Planta Medica*, 62, 217-221, 1996.
- (78) Mockute D., Bemotiene G. 1,8-Cineole-Caryophyllene oxide chemotype of essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Vilnius (Lithuania). *J. Essent. Oil Res.* Vol.16, 236-238, May/June 2004.
- (79) Martinez R.M., Jordan M.J., Quillez M., Sotomayor J. A. Effects of edaphoclimatic conditions on *Thymus hyemalis* L. essential oil yield and composition, *J. Essent. Oil Res.* Vol.17, 614-618, november/december 2005.
- (80) Slavkovska V.N., Lakusic B.S., Jancic R.B. Chemical composition of the essential oil of *Thymus bracteosus* Vis. Ex Benth (Lamiaceae). *J. Essent. Oil Res.* Vol.18, 310-311, May/June 2006.
- (81) Horvath G., Szabo L.G. Essential oil of three cultivated *Thymus* chemotypes from Hungary, *J. Essent. Oil Res.* Vol.18, 315-317, May/June 2006.
- (82) Asllani U., Toska V. Chemical composition of Albanian thyme oil (*Thymus vulgaris* L.), *J. Essent. Oil Res.* Vol.15, 165-167, May/June 2003.
- (83) Morteza-semnani K., Rostami B. Essential oil composition of *Thymus kotschyanus* and *Thymus pubescens* from Iran, *J. Essent. Oil Res.*, Vol.18, 272-274, May/June 2006.
- (84) Sefidkon F., Kavandi R., Atri M., Barazandeh M.M. Essential oil variability of *Thymus eryocalyx* (Ronniger) jalas, *Flavour Fragr. J.* 20, 521-524, 2005.
- (85) Loziene K. Chemical composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. ssp. *Serpyllum* growing wild in Lithuania. *J. Essent. Oil Res.* Vol.18, 206-211, Mrch/april 2006.
- (86) Miguel M.G., Guerrero C., Rodrigues H, Brito J.C., et al. Main components of the essential oils from wild Portuguese *Thymus mastichina* (L.) L. ssp. *mastichina* in different development stages or under culture conditions. *J. Essent. Oil Res.* Vol. 16, 111-114, 2004.
- (87) Sokoman A., Gulluce M., Akpulat H. , Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokomen M., Sahin F. The in vitro antimicrobial and antioxidant of the essential oils and extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15, 627-634, 2004.
- (88) Rasooli I., Abyaneh M.R. Inhibitory effects of thyme oils on the growth of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*, *Food Control*, 2004, 15, 479-483.
- (89) Miguel, M. G., Duarte F., Venâncio, F., Tavares, R. Variation in the main components of the essential oils of leaves and flowers of Portuguese *Thymus albicans* over a single season. *J. Essent. Oil Res.* Vol. 16, 169-171, May/June 2004.
- (90) Bagamboula C.F, Uyttendaele M., Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oil, thymol, carvacrol, estragol and p-cymène towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.* 21, 2004, 33-42.
- (91) Jordan M. J., Martinez R.M., Goodner K.R., Baldwin E.A., Sotomayor J.A. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products*, 2006, 24, 253-263.

- (92) Hudaib M., Speroni E., Di Pietra A. M., Cavrini V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variation during the vegetative cycle. *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 2002, 29, 691-700.
- (93) Loziene K., Vaiciuniene J., Venskutonis P.R. Chemical composition of the essential oils of different varieties of thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Lithuania. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2003, 31, 249-259.
- (94) Miguel M.G, Figueiredo A.C., Costa M. M., Martins D., Duarte J., Barroso J.G., Pedro.L.G. Effects of the volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *Th. Mastichina*, *Th. Carnosus* and *Thymbra capitata* in sunflower oil. *Nahrung. Food*, 2003, 47, N°6, 397-402.
- (95) Dob T., Dahmane D., Benabdelkader T., Chelghoum C. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., *The International Journal of Aromatherapy*, 2006, 16, 95-100.
- (95a) Hazzit M., Baaliouamer A. Essential Oil Composition of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. and *Thymus numidicus* Poirlet from Algeria. *Riv. Ital. EPPOS*, Vol. 17, N°43, Aout 2007.
- (95b) Hazzit M., Baaliouamer A. Variation of Essential Oil Yield and Composition of *Thymus pallescens* de Noé from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, (in press).
- (95c) Hazzit M., Baaliouamer A., Faleiro M. Leonor, Miguel M. Graça. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antibacterial activities. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 6314-6321.
- (96) Marti D., Perez-Garcia M.T, Blanquer A., Villagrasa V., Sanahuja M.A., Moreno L. *Thymus piperella* (L.) essential oil: an alternative in the treatment of diarrhoea. *Flavour Fragr. J.* 2007, 22, 201-205.
- (97) Kabouche A., Kabouche Z., Bruneau C. Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* (Poirlet) from Algeria. *Flavour Fragr. J.* 2005, 20, 235-236.
- (98) Hedhili L., Romdhane M. Abderrabba A., Planche H., Cherif I. Variability in essential oil composition of Tunisian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link. *Flavour Fragr. J.* 2002, 17, 26-28.
- (99) Vardar-ünlü G., Candan F., Sokmen A., Daferera D., Polissiou M., Sökmen M., Dönmez E., Tepe B., Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). *J. Agric. Food Chem.* 2003 51, 63-67.
- (100) Salgueiro L.R., Pinto E., Gonçalves M.J., Costa I., Palmeira A., Cavaleiro C., Pina-vaz C., Gonçalves Rodrigues A., Martinez-de-Oliveira J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus capitellatus* against *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte strains. *Flavour Fragr. J.* 2006, 21, 749-753.
- (101) Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Costa M.M., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro.L.G. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus Capitatus* Hoff.et Link. *Food Chem.* 2007, 105, 146-155.
- (102) Faleiro, M.L.; Miguel M.G.; Ladeiro, F.; Venâncio, F.; Tavares, R.; Brito, J.C.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Pedro, I.G. Antimicrobial activity of the essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*, *Lett. Appl. Microbiol.* 2003, 36, 35-40.
- (103) Miguel, G.; Simões, M.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G.; Carvalho, L. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespitosus*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chem.* 2004, 86, 183-188.

- (104) Chorianopoulos, N.; Kalpoutzakis, E.; Aligiannis, N.; Mitaku, S.; Nychas, G. J.; Haroutounian, S. A., Essential oils of *Satureja*, *Origanum* and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 8261-8267.
- (105) Rasooli, I; Mirmostafa, S.A., Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus Kotschyanus* and *Thymus percius*. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2200-2205.
- (106) Hadeif, H.; Giordani, R.; Regli, P.; Cherfour, A.; Abou, L.; Mikail, C.; Portugal, H. Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. et de *Thymus numidicus* Poiret d'Algérie. 6^{ème} Symposium International d'Aromathérapie Scientifique et Plantes Médicinales. Palais des congrès, Grasse, 2004.
- (107) Faleiro, L.; Miguel, G.; Gomes, S.; Costa, L.; Venâncio, F.; Teixeira, A.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G. Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 8162-8168.
- (108) Houmani, Z.; Azzoudj, S.; Naxakis, G.; Skoula, M. The essential oil composition of Algerian Zaâtar: *Origanum* ssp. and *Thymus* ssp. *J. Herbs, Spices Medicinal Plants.* 2002, 9, 275- 280.
- (109) Jordan, M.J., Martinez, R.M., Goodner, K.L., Baldwin, E.A., Sotomajor, J.A. Seasonal variation of *Thymus Hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition, *Industrial Crops and Products*, 2006, 24, 253-263.
- (110) Loziene, K., Vaiciuniené, venskutonis, P. R. Chemical Composition of the essential oil of different varieties of thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Lithuania. *Biochemical systematics and ecology*, 2006, 31, 249-259.
- (111) De Feo, V., Bruno, M., Tahiri, B., Napolitano, F., Senatore, F. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Thymus spinulosus* Ten. (Lamiaceae), *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 3849-3863.
- (112) Chorianopoulos N., Kalpoutzakis E., Aligiannis N., Mitaku S., Nychas G.J., Haroutounian S.A. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: Chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 8261-8267.
- (113) Bruni A. and Modenesi P. Development, oil storage and dehiscence of peltate trichomes in *Thymus vulgaris* (Lamiaceae), *Nord. J. Bot.* 1983, 3, 245-251,
- (114) Miguel M.G., Guerrero, C.A.C, Brito, J.M.C., Venâncio, F., Tavares, R., Martins, A., Duarte, F. Essential oils from *Thymus mastichina* (L.) ssp. *mastichina* and *Thymus albicans* Hoffmanns & Link. *Acta Hort.*, pp. 500, 1999.
- (115) Salgueiro, L. R., Vila, R., Tomi, F., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Canigüeral, S., Casanova, J., Proença da Cunha, A., Adzet, T. Variability of essential oils of *Thymus caespitosus* from Portugal, *Phytochem.* 1997, 45, 307-311.
- (116) Arrebola, M.L., Navarro, M.C., Jiménez, J. Essential oils from *satureja obovata*, *Thymus serpylloides* ssp. *serpylloides* and *T. serpylloides* ssp. *gadorensis* micropropagated plants. *J. Essent. Oil Re.* 1997, 9, 533-536.
- (117) Marhuenda, E., & Alarcon de la Lastra, C.A. Composition of essential oil of *Thymus carnosus* and its variation, *Fitoterapia*, 1987, 57, 448-450.

- (118) Morales, R. Taxonomia de los Géneros *Thymus* (excluida la seccion *serpyllum*) y *Thymbra* en la peninsula Iberica, *Ruizia*, 1986, 3, 5, 324.
- (119) Tantaoui-Elaraki A., Lattaoui N., Errifi A., Benjlali B. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus broussonettii*, *T. zygis* and *T. satureioides*, *J. Essent. Oil Res.* 1993, 5, 45-53.
- (120) Stahl-Biskup, E. Das ätherische Öl Norwegischer Thymianarten. I. *Thymus praecox* ssp. *arctius*, *Acta Medica*, 52, 223-235, 1986.
- (121) Saez, F. Essential oil variability of *Thymus zygis* growing wild in southeastern Spain, *Phytochem.* 1995, 40, 819-825.
- (122) Granger R., Passet J. *Thymus vulgaris* spontané de France: Race chimique et chémotaxonomie, *Phytochem.* 1973, 12, 1683-1691.
- (123) Baser K.H.C., Ozek T., Kirimer N., Tümen G. The occurrence of three chemotypes of *Thymus longicaulis* C. Presl. Subsp. *Longicaulis* in the same population, *J. Essent. Oil Res.* 1993, 5, 291-295.
- (124) Kulevanova, S., Ristic, M., Stafilov, T., Matevski T. Composition of *Thymus albanus* ssp. *albanus* H. Braun from Macedonia. *J. Essent. Oil Res.* 1998, 10, 335-336.
- (125) Mahmoud S., Coteau R. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and mentofuransynthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 98, 8915-8920.
- (126) Adam K.-P., Zapp J. Biosynthesis of isoprene units of camomile sesquiterpenes. *Phytochem.*, 1998, 48, 953-959.
- (127) Croteau R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenes. *Chem. Rev.*, 1987, 87, 929-954.
- (128) Passet J. *Thymus vulgaris* L.: *Chemotaxonomie et biogenèse monoterpéniques*, PhD, Thesis, Faculté de Pharmacie, Montpellier, 1971, France.
- (129) Vernet P., Gouyon P.H., Valdeyron G. Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L.: a case of polymorphism in a biosynthetic chain, *Genetica*, 1986, 69, 227-231.
- (130) Poulose J., Croteau R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1978, 187, 307-314.
- (131) Vokou D, Kokkini S., and Bessière J.M. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils, *Biochem. Systematics and ecology*, 1993, 21, 287-295.
- (132) Ietswaart J.H. A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae), PhD Thesis, Leiden Botanical series 4, Leiden University Press, The Hague, Netherland, 1980.
- (133) Danin A. Two new species of *Origanum* (Labiatae) from Jordan, *Willdenowia*, 1990, 19, 401-404.
- (134) Danin A., and Künne I. *Origanum jordanicum* (Labiatae), a new species from Jordan, and notes on the other species of *Origanum* sect. *Campanulatalyx*, *Willdenowia*, 1996, 25, 601-611.
- (135) Ruberto G., Bartta M.T., Sari M., Kaabeche M. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum Glandulosum* Desf. *Flavour Fragr. J.*, 2002, 8, 331-337.
- (136) Kokkini S. *Proceedings of the IPGRI international workshop on oregano. Valenzano (Bari), Italy.* Rome, 1997.
- (137) Karosou R. Taxonomic studies on the Cretan Labiatae: Distribution, morphology, and essential oils. PhD Thesis. University of Thessaloniki, Grece, 1995.

- (138) Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini A.F. et Costa J. Antimicrobial activity and composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation, *Food Chem.*, 2008, 106, 132-139.
- (139) Fischer N., Nitz S., Drawert F. Original flavour compounds and the essential oil composition of marjoram (*Majorana hortensis* Moench), *Flavour fragr. J.*, 1987, 2,55-61.
- (140) Baser K.H.C. Kürkçüoğlu M.; Houmani Z.; Abed I. Composition of the essential oil of *Origanum floribundum* Munby from Algeria. *J. Essent. Oil Res.* 2000, 12, 753-756.
- (141) Lawrence B.M. The botanical and chemical aspects of oregano, *Perfumer and Flavorist*, 1984, 9, 41-51.
- (142) Figuéredo G., Cabassi P., Chalchat J.C., Pasquier B. Studies of Mediterranean oregano populations. VIII: Chemical composition of essential oil of Oreganos of various origins, *Flavour Fragr. J.*, 2006, 21, 134-139.
- (143) Figuéredo G., Chalchat J.C., Pasquier B. A study of mediterranean oregano populations : Chemical composition of essential oils of *Origanum codifolium* Monbret et Aucher from two populations in Cyprus, *J. Essent. Oil Res.*, 17, 635-64, November/December 2005.
- (144) Figuéredo G., Chalchat J.C., Pasquier B. Studies of Mediterranean oregano populations. III: Chemical composition of essential oils of *Origanum Dayi* Post from Israel, *J. Essent. Oil Res.*, 18, 250-252, May/june 2006.
- (145) Padulosi S., *Proceedings on the IPGRI international workshop on Oregano*, 8-12 May 1996, CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy.
- (146) Eymard S. Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. Thèse Doctorat, Université de Nantes, France, 2003.
- (147) Hultin, H.O. Lipid Oxidation in Fish Muscle. *In: Advances in seafood biochemistry: Composition and quality.* Flick, G.J. & Martin, R.E. (Eds.), Technomics Publishing Compagny Inc, Lancaster; 99-122, 1992.
- (148) Hultin, H.O. Oxidation of lipids in seafoods. *In: Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality.* Shahidi, F. & Botta, J.R. (Eds), Blackie Academic & Professional, New York; 49-74, 1994.
- (149) German J.B., Kinsella J.F. Lipid oxidation in fish tissue: Enzymatic initiation via lipoxygenase, *J. Agric. Food Chem.*, 1985, 33, 680-683.
- (150) Hsieh R.J., Kinsella J.F. Lipoxygenase generation of specific volatile flavour carbonyl compounds in fish tissues, *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37, 279-286.
- (151) Love, R.M. *The Chemical Biology of Fishes.* Vol.2. Academic Press London; 1968-1977, 1980.
- (152) Kanner, J., German, J.B. and Kinsella, J.E. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Food Science and Nutrition*, 1987, 25, 317.
- (153) Khayat, A. and Schwall, D. Lipid oxidation in seafood. *Food Tech.* 1983, 130-140.
- (154) Genot, C. Congélation et qualité de la viande. Techniques et pratiques, INRA Editions, Paris, 2000.
- (155) Gunstone fo., Norris Fa. *In: lipids in Food-Chemistry. Biochemistry and Technology*, Pergamon Press, 161- 165, 1983.

- (156) Pszczola D.E. Antioxidants : from preserving food quality to quality of life. *Food Technology*. 2001, 55 51-59.
- (157) Kortenska, V.D., Yanishlieva, N.V., Kasaikina, O.T., Totzeva, I.R., Boneva, M.I. and Russina, I.F. Phenol antioxydant efficiency in various lipid substrates containing hydroxy compounds. *European Journal of Lipid Sciences and Technology*. 2002, 104, 513-519.
- (158) Decker, E.A. and Xu, Z. Minimizing rancidity in muscle food. *Food technology*. 1998, **52**, 54-61.
- (159) Roeding-Penman A. et Gordon M. H. Antioxidant properties of Myricetin and Quercetin in oil and emulsions. *JAOCS*, 1998, 75, 169- 180.
- (160) Moll M, Moll N. Les additifs alimentaires et auxiliaires technologiques, Ed. Dunod, 2nd Edition Paris, Technique et Ingénierie, série Agro-alimentaire, 1998.
- (161) Arnao M.B., Cano A., Acosta M. Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology. *Recent Research and development in Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 2, 893-905.
- (162) Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative process In fruits, *Food Chem.*, 1999, 66, 401-406.
- (163) Sanchez-Moreno C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Sci. Tech. Int.*, 2002, 8(3), 121-137.
- (164) Raemy A., Froelicher I., Lölliger J. Oxidation of lipids studied by isothermal heat flux calorimetry, *Thermochimica acta*. 1987, 114, 159-164.
- (165) Miyazawa T., Fujimoto K., Kinoshita M., Usuki R. Rapid estimation of peroxide content of soybean oil by measuring thermoluminescence, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1994, 71, 343-345.
- (166) Koskas J.P., Cillard J., Cillard P. Direct high performance liquid Chromatographic separation of hydroperoxyde isomers of linoleic acid. *J. Chromatogr.*, 1983, 258, 280-283.
- (167) Saidia B., Hammond E. Quantification of Carbonyls produced by the decomposition of hydroperoxydes, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1989, 66, 1097-1102.
- (168) Berset C., Cuvelier M.E. Revue : Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant, *Science des Aliments*, 1996, 16, 219-245.
- (169) Mathew S., Emilia Abraham T. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models, *Food Chem.*, 2006, 94, 520-528.
- (170) Sahin F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Polissiou M., Agar G., Özer H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the eastern Anatolia region of Turkey, *Food Chem.*, 2004, 15, 549-557.
- (171) Singh G., Marimuthu P., De Heluani C.S., Catalan C.A.N. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 174-181.
- (172) Jirovetz L., Buchbauer G., Stoilova I., Stonayova A., Krastanov A., Schmidt E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 6303-6307.
- (173) Siddhuraju P., Becker K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts, *Food chem.*, 2007, 101, 10-19.

- (174) Kartal N., Sokmen M., Tepe B., Dferera D., Polissiou M., Sokmen A. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure, *Food chem.*, 2007, 100, 284-289.
- (175) Koga T., Terrao J. Antioxidant activity of a novel phosphatidyl derivative of vitamine E in lard and its model system, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42, 1291-1294.
- (176) Okada Y., Kancko M., Okajima H., Okajima H. Hydroxyl radical scavenging activity of naturally occurring furan fatty acids, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1996, 19, 1607-1610.
- (177) Mc Gookin B., Augustin M.A. Antioxidant activity of casein and Maillard reaction products from casein-sugar mixtures, *J. Dairy Res.*, 1991, 58, 313-320.
- (178) Rathee J.S, Patro B.S, Mula S., Gamre S., Chattopadhyay S. Antioxidant activity of *Piper betel* leaf extract and its constituents, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 9046-9054.
- (179) Burits M., Asres K., Bucar F. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemessia afra*, *Artemessia abyssinica* and *Junepurus procera*, *Phytotherapy Res.*, 2001, 15, 103-108.
- (180) Kumaran A., Karunakaran R.J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*, *Food Chem.*, 2006, 97, 109-114.
- (181) Tepe B., Akpulat H.A., Sokmen M., Daferera D., yumratus O., Aydin E., Polissiou M., Sokmen A. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pinpinella flabellifolia* from Turkey, *Food Chem.*, 2006, 97, 719-724.
- (182) Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Sokmen A. In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey, *Food Chem.*, 2005, 92, 89-92.
- (183) Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Sokmen A. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey, *Food Chem.*, 2006, 95, 200-204.
- (184) Sacchetti G., Medici A., Maetti S., Radice M., Muzzoli M., Manfredini S., Braccioli E., Bruni R. Composition and functional properties of the essential oil Amazonian basil, *Ocium micranthum* Wild., Labiatae in comparison with commercial essential oils, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 3486-3491.
- (185) Magwa M.L., Gundidza M., Gweru N., Humphrey G. Chemical composition and biological activities of essential oils from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*, *food Chem.*, 2006, 103, 85-89.
- (186) Halliwell B., Murcia M.A., Chirico S., Aruoma O.I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1995, 35, 7-20.
- (187) Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Wilzlum J.L. *N. Engl. J. Med.*, 320, p.915, 1989.
- (188) Gardes-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité Chimique*, 91-96, Novembre-Décembre 2003.
- (189) Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Research Communications*, 1990, 9, 1-32.
- (190) de Billerbeck, G. Activité fongique de l'huile essentielle de *cymbopogon nardus* sur *laspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur." *Faculté des sciences pharmaceutiques*, Institut national polytechnique de Toulouse (236), 2000.

- (191) Pibiri, M.-C., C. Seigniez, et al. "Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants". *CISBAT 2001*, Lausanne, LESO, EPFL, 2001.
- (192) Hulin V., Mathot A.G., Mafart P. et Dufossé L., les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, 1998, 18, 563-582.
- (193) Davidson P.M., Parish M.E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. *Food Technology*, 1989, 43, 148-155.
- (194) Kunle, O. et al. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract, *Phytomedicine*, 2003, 10- 59-61.
- (195) Carson, C. F. & Riley, T. V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Malaleuca alternifolia*, *J. Appl. Bacteriol.*, 1995, 78- 264-269.
- (196) Lambert, R. J. W., P. N. Skandamis, et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *J. Appl. Microbiol.*, 2001, 91- (3), 453-462.
- (197) Walsh, S. E., J.-Y. Maillard, et al. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria, *J. Appl. Microbiol.*, 2003, 94 (2), 240-247.
- (198) Hammer, K. A., Carson, C. F. et al. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil, *J Appl. Microbiol.*, 2003, 95, (4), 853-860.
- (199) Hermal, C. Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier 1 (87), 1993.
- (200) Zaika, L. L. Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its Determination, *J. Food Safety*, 1988, 9, (2), 97-118.
- (201) Dorman, H. J. D. & Deans S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *J. Appl. Microbiol.*, 2000, 88, (2), 308-316.
- (202) Deans, S. G. & Ritchie G. Antibacterial properties of plant essential oils, *International J. Food Microbiol.*, 1987, 5, 162-180.
- (203) Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G. et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils, *Lett. Appl. Microbiol.*, 1999, 29, (2) 130-135.
- (204) Sarbach, R. Contribution à l'étude de la désinfection chimique des atmosphères, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes, 1962.
- (205) Sivropoulou, A., Papanikolaou, E. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils, *J. Food Chem.*, 1996, 44, 1202-1205.
- (206) Lahlou, M. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytotherapy Res.*, 2004, 18, 435-448.
- (207) Griffin, S. G., Wyllie S. G., et al. The role of structure and molecular properties of terpénoïdes in determining their antimicrobial activity, *Flavour Fragr. J.*, 1999, 14, 322-332.
- (208) Valero M., Salmeron M.C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth, *International J. Food Microbiol.*, 2003, 85, 73-81.
- (209) Franchome P., Péroël D. et al. Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique : matière, énergie, information, L'aromathérapie exactement, R.J. Editeur, Limoges, 2, 73-227, 1990.

- (210) Cox, S. D., Mann C. M. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), *J. Appl. Microbiol.*, 2000, 88, 1, 170-175.
- (211) Didry, N., Dubreuil, L. et al. Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldéhyde cinnamique seuls ou associés, *Pharmacize*, 1993, 48, 301-304.
- (213) Mann, C. M. & Markham, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils, *J. Appl. Microbiol.*, 1998, 84, 4, 538-544 .
- (214) Arnal-Schnebel B., Hadji-Minaglou F., Peroteau J-F., Ribeyre F., de Billerbeck V.G. Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases, *The International Journal of Aromatherapy*, 2004, 14, 192–197.
- (215) Lin Y. T., Labbe R. G., Kalidas, S. Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2005, 6, 453 – 458.
- (216) Fauchère, J.-L. et Avril, J.-L. Bactériologie générale et médicale, Ellipses Editions, Paris, 365 p., 2002.
- (217) Pattnaik S., Subramanyam, V.R., et al. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbiol.*, 1996, 86, 237-246.
- (218) Smith-Palmer, A., Stewart, J. et al. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens, *Lett. Appl. Microbiol.*, 1998, 26, 2, 118-122.
- (219) Lis-Balchin, M., Hart, S. L. et al. Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils, originating in Australia and New Zealand, *Phytotherapy Res.*, 2000, 14, 23-629.
- (220) Burt, S. A. & Reinders, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, 36, 3, 162-167.
- (221) Moleyar, V., & Narasimham, P. Antibacterial activity of essential oils components. *Inter. J. Food Microbiol.*, 1992, 16, 337-342.
- (222) Bowles B.L., Sackitey S.K., Willams A.C. inhibitory effects on flavour compounds on *Staphylococcus aureus* WRRC B 124., *Journal of Food Safety*, 1995, 15, 337-347.
- (223) Jay J.M., Rivers G.M. Antimicrobial activity of some food flavouring compounds, *Journal Food Safety* , 1984, 6, 129-139.
- (224) Sanchez-Moreno C., Lurrari J.A., and Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols , *J. Sci. Food Agric.*, 1998, 76, 270-276.
- (225) Burits M.; Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res.*, 2000, 14, 323-328.
- (226) Şahin F.; Güllüce M.; Daferera D.; Sökmen, A.; Sökmen M.; Polissiou M.; Agar G.; Özer H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control.*, 2004, 15, 549-557.
- (227) Halliwell B., Gutteridge J. M. C., & Aruoma O. The deoxyribose method: A simple “test tube” assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals, *Analytical Biochem.*, 1987, 165, 215-219.
- (228) Sharma S., De Bont J.A.M., et Sangwan R.S. developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint, *Current Science*, 2003, 84, (25), 544-550.

- (229) Wagner G.J., Wang E. et Shepherd R.W. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome, *Ann. Botany*, 2004, 93 (1), 3-11.
- (230) Sari M., Kaabeche M., Mandalari G., D'Arrigo M., Bisignano G., Saija A., Daquino C., Ruberto, G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf., *Flavour Fragr. J.*, 2006, 21, 890-898.
- (231) Belhattab R., Larous L., Figueiredo A.C., Santos P.A.G, Barroso J.G., Pedro L.G. *Origanum glandulosum* Desf. Grown wild in Algeria: Essential oil composition and glycosidic bound volatiles, *Flavour Fragr. J.*, 2005, 20, 209-212.
- (232) Benjilali B., Hammoumi M., M'hamedi A. et Richard H. Composition chimique des huiles essentielles de diverses variétés de thym du Maroc. II. Analyse en composantes principales (ACP), *Science des Aliments*, 1987, 7, 275-299.
- (233) Aboutabl E., A., and El-dahmy S.I. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.*, 1995, 33, 87-90.
- (234) Atti-Santos A C., Pansera M. R., Paroul N., Atti-Serafini L. and Monya P. Seasonal variation of essential oil yield and composition of *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) from South Brazil. *J. Essent. Oil Res.*, 2004, 16, 294-295.
- (235) Giner R. M., Maner S. and Rios J. L. Seasonal variations in the essential oils of *Santolina chamacyparissus*. *Sc. Pharmacol.*, 1993, 61 (3), 169-173..
- (236) Venkutonis P.R., Poll L., Larsen M. Influence of drying and irradiation on the composition of the volatile compounds of thyme (*Thymus vulgaris* L.), *Flavour Fragr. J.*, 1996, 11, 123-128.
- (237) Gil M.I., Thomàs-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M., Kader A.A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 4581-4589.
- (238) Madsen, H. L., & Bertelsen, G. Spices and antioxidants, *Trends in Food Science and Technology*, 1995, 6, 271-277.
- (239) Perrin, J-L. Détermination de l'altération, in : Karleskind A. (ed.), *Manuel des corps gras*, 1198-1218, Lavoisier, Paris, 1992.
- (240) Hoyland D.V., Taylor A.J. A review of the methodology of the 2-Thiobarbituric acid test, *Food Chem.*, 1991, 40, 271-291.
- (241) Pryor W.A., Strickland T., & Church D.F. Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulphate micelle solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 2224 - 2229.
- (242) Baratta, M.T., Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Biondi, D.M. & Ruberto, G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, 1998, 10, 618-627.
- (243) Dorman H. J., Deans S. G. Chemical composition, antimicrobial and in vitro antioxidant properties of *Monarda citriodora* var. *citriodora*, *Miristica fragrans*, *Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*, pelargonium sp. and *Thymus zygis* oils. *J. Essent. Oil Res.*, 2004, 16, 145-150.
- (244) Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radical in biology and medicine, 3rd ed., Oxford University Press, 1999.

- (245) Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases, *Molecular Aspects of Medicine*, pp.416-494, Oxford: Clarendon Press, 1985.
- (246) Decker, E.A., Crum, A.D., & Calvert, J.T. Difference in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, 756-759.
- (247) Aruoma, O.I. Déoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals, *Methods in Enzymology*, 1994, 233, 57-66.
- (248) Gülçin, I., Güngör Sat, I., Beydemir S., Elmastas, M., Ifran Küfreviöglu, O. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.), *Food Chem.*, 2004.
- (249) Mau J-L, Tsai S-Y, Tseng Y-H, Huang S-J, Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*, *Food Chem.*, 2005, 91, 641-649.
- (250) Meena, M.R., et Sethi, V. Antimicrobial activity of the essential oils from spices, *J. Food Sc. Techn. Mysore*, 1994, 31, 68-70.
- (251) Ela, M.A., El-Shaer, N.S., Ghanem, N.B. Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils, *Pharmazie*, 1996, 51, 993-995.
- (252) Juven B.J., Kanner J., Schved, F. and Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents, *J. Appl. Bacteriol.*, 1994, 76, 626-631.
- (253) Kivanç M., and Akgul A. Effect of some essential oil components on the growth of food-borne bacteria and synergism with some food I, gradients, *Flavour Fragr. J.*, 1988, 3, 95-98.
- (254) Ultee, A., Kets, Slump, R.A., Steging, G. and Smid, E.J. antimicrobial activity of carvacrol on rice, *J. Food Prot.*, 2000, 63, 620-624.
- (255) Ultee, A. Kets E.P.W., Alberda M., Hoekstra F.A., and Smid E.J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol, *Archives of Microbiology*, 2002, 174, 233-238.
- (256) Knowles J.R., Roller S., Murray D.B., and Naidu A.S. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*, *Appl. Environm. Microbiol.*, 2005, 71, 797-803.
- (257) Chang S.T., Chen P.F., and Chang S. C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *cinnamomum osmophloeum*, *J. Ethnopharm.*, 2000, 77, 123-127.
- (258) Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. Inhibitory effects of selected essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, *Food Control*, 2007, 18, 414-420.
- (259) Decouzon M., G ribaldi S., Rouillard M., Sturla J.-M. A new look at the spectroscopic properties of dihydrocarveol stereoisomers, *Flavour Fragr. J.*, 1990, 5, 147-152.
- (260) Jennings W.; Shibamoto T. Qualitative analysis of flavours and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. Academic Press, New York, 1980.
- (261) Lamont R.J., Postlethwaite R., Mac Gowan A.P. *Listeria monocytogenes* and its role in human infection. *J. Infect.* 1988, 17, 7-28.
- (262) Farber J.M., Coates F., Daley E. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 1992, 15, 103-105.

- (263) Van-Renterghem B., Huysman F., Rygole R., Verstraete W. Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. *J. Applied Bacteriology*, 1991, 71, 211-217.
- (264) Wenger J.D., Swaminathan B., Hayes P.S., Green S.S., Pratt M., Pinner R.W., Schuchat A., Broome C.V. *Listeria monocytogenes* contamination of Turkeys franks: Evaluation of a production facility. *J. Food Prot.*, 1990, 53, 1.15-1019.
- (265) Farber J.M., Peterkin P.I. *Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen. *Microbiology Review*. 1991, 55, 476-511.
- (266) Shwartz B., Ciesielski C.A., Broome C.V., Gaventa S., Brown G.R., Gellin B.G., Hightower A.W., Mascola L. The *Listeria* study group. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hotdogs and under-cooked chicken. *Lancet ii*, 1988, 779-782.
- (267) Chikhoun A. Huiles essentielles de thym et d'origan : étude de la composition chimique et de l'activité antioxydante et antimicrobienne. Thèse de magister, Institut National Agronomique (INA), 2007.
- (268) Oyaizu M. Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan J. Nutr.*, 1986, 44, 307-315.
- (269) Bennis, S., Chami, F.S. et al. Surface alteration of *Saccharomyces cervisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 38, 454-458.
- (270) Gray, J. Measurement of lipid oxidation: a review. *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, 55, 839-546.
- (271) Giraud J.P. Microbiologie Alimentaire. Ed. Dunod, Paris. 652p, 2003.
- (272) Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. Microbiologie alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed. Tec. Et Doc., Paris, 672p, 1996.
- (273) Leclerc H., Gaillard J. L., Simonet M. Microbiologie générale : La bactérie et le monde bactérien. Ed. Doin, Paris, 535p, 1995.
- (274) Nakatani N. et Kikuzaki H., 1987. A new antioxydative glucoside isolated from Oregano (*Origanum vulgare* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 1987, 51, n°10, 2727-2732.
- (275) Chao S.C., Young D.G. et Oberg G.J.. Screening for inhibitory activity of Essential Oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. *J. Essent. Oil Res.*, 2000, 12, 639-649.