

***Huiles essentielles de thym et d'origan***  
**étude de la composition chimique, de l'activité  
antioxydante et antimicrobienne**

Réalisé par :

**CHIKHOUNE Amirouche**

Directeur de thèse: Mr. ASSAMI M.K. Maître de conférences (INA)

Co-Directeur de thèse: Mr. HAZZIT M. Chargé de cours (INA)

20/06/07

JURY: Président: Mr. BELLAL M.M. Professeur (INA) Examineurs: Mr. FERRADJI A. Maître de conférences (INA) Mr. BOUSNADJI R. Docteur d'Etat (Min. Commerce)



# Table des matières

Remerciements . .	7
Liste des abréviations . .	8
Abstract . .	10
Résumé . .	11
Introduction générale . .	12
Chapitre I : Les huiles essentielles . .	14
Historique . .	14
Définition . .	14
Propriétés physico-chimiques . .	15
Composition chimique . .	15
Groupes chimiques des HE . .	16
Localisation des huiles essentielles . .	17
Fonction biologique des huiles essentielles . .	17
Toxicité des huiles essentielles . .	17
Toxicité par ingestion . .	18
Toxicité dermique . .	18
Toxicité selon la composition . .	18
Toxicité sur cellules animales ou humaines . .	18
Utilisation des HE . .	18
En industrie agro-alimentaire . .	19
Aromathérapie . .	19
Procédés d'extraction des huiles essentielles . .	19
Expression à froid . .	19
Extraction à la vapeur d'eau . .	19
Extraction par le CO <sub>2</sub> à l'état supercritique . .	21
Extraction au moyen de solvants . .	21
Analyse des huiles essentielles . .	22
Chromatographie en phase gazeuse (CPG) . .	22
Spectrométrie de masse (SM) . .	23
Le couplage CG/SM . .	23
Conclusion . .	24
Monographie des plantes étudiées . .	25
Thym . .	25
Historique . .	25
Caractéristiques botaniques . .	25
Classification . .	25
Localisation et répartition géographique . .	26
Huile essentielle du thym . .	28
Principales utilisations du thym . .	29
Origan . .	29

Historique et origine . . .	29
Caractéristiques botaniques . . .	30
Répartition géographique . . .	30
Huile essentielle d'origan . . .	31
Principales utilisations de l'origan . . .	32
<b>Chapitre III : Oxydation des lipides et antioxydants . . .</b>	<b>33</b>
Introduction . . .	33
Mécanismes généraux de l'oxydation des lipides . . .	33
Auto-oxydation . . .	34
Photo-oxydation . . .	35
Voie enzymatique . . .	36
Les initiateurs de l'oxydation des lipides . . .	37
Initiation par les formes activées de l'oxygène . . .	37
Initiation par les métaux . . .	38
Facteurs environnementaux . . .	38
Les antioxydants . . .	39
Définition . . .	40
Classement des antioxydants . . .	40
Mesure du degré d'oxydation des lipides . . .	43
Analyse des substrats de l'oxydation . . .	43
Mesure des produits primaires . . .	43
Mesure des produits secondaires . . .	44
Evaluation sensorielle . . .	45
Tests d'efficacité des antioxydants . . .	45
Conclusion . . .	46
<b>Chapitre IV : L'activité antimicrobienne des HE . . .</b>	<b>47</b>
Historique . . .	47
Activité antibactérienne . . .	47
Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales bactéricides . . .	47
Bactéricidie et bactériostase . . .	48
Souches microbiennes . . .	48
Rôle de la méthode dans la détermination de l'activité . . .	48
Méthodes de détermination de l'activité . . .	49
Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des HE . . .	52
Application des HE sur les aliments . . .	52
<b>Chapitre V : Matériels et méthodes . . .</b>	<b>54</b>
Matériel végétal . . .	54
Description des espèces étudiées . . .	54
Localisation des sites producteurs d'huiles essentielles . . .	56
Extraction des huiles essentielles . . .	57
Extraction par solvants volatils . . .	57

Extraction par hydrodistillation . . .	58
Cinétique de l'extraction . . .	58
Rendement de l'extraction . . .	58
Fractionnement des huiles essentielles . . .	58
Caractéristiques des HE . . .	58
Indices physico-chimiques . . .	59
Analyse qualitative et semi-quantitative des HE par CPG et CG/SM . . .	59
Evaluation de l'activité antioxydante des HE . . .	61
Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH <sup>+</sup> . . .	61
Test de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) . . .	61
Mesure du pouvoir réducteur . . .	62
Mesure du pouvoir de piégeage du radical hydroxyle (OH <sup>-</sup> ) . . .	63
Indice de peroxyde (IP) : ISO 3960 . . .	64
Mesures des diènes conjugués : Norme ISO 3656 . . .	65
Dosage des acides gras par chromatographie phase gazeuse . . .	66
Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE . . .	66
Principe . . .	67
Micro-organismes testés . . .	67
Protocole expérimental . . .	67
Analyse statistique . . .	69
Chapitre VI : Résultats et discussions . . .	70
Localisation des sites producteurs d'huiles essentielles . . .	70
Les Thymus . . .	70
L'origan . . .	71
Rendement de l'extraction en HE . . .	72
Les Thymus . . .	72
L'origan . . .	72
La cinétique d'extraction des HE . . .	72
Cas du thym ( <i>Thymus pallescens</i> ) . . .	73
Cas de l'origan . . .	75
Conclusion . . .	78
Caractéristiques des HE . . .	78
Caractéristiques physiques et organoleptiques . . .	78
Analyse qualitative et semi-quantitative des HE par CPG et CG/SM . . .	80
Evaluation de l'activité antioxydante des HE . . .	104
Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH . . .	104
Test de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) . . .	107
Mesure du pouvoir réducteur . . .	111
Mesure du pouvoir de piégeage du radical hydroxyle (OH <sup>-</sup> ) . . .	112
Indice de peroxyde (IP) . . .	114
Mesures des diènes conjugués . . .	116

<b>Dosage des acides gras par chromatographie phase gazeuse . .</b>	<b>117</b>
<b>Conclusion . .</b>	<b>118</b>
<b>Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE . .</b>	<b>118</b>
<b>Bactéries Gram négatif . .</b>	<b>119</b>
<b>Bactéries Gram positif . .</b>	<b>121</b>
<b>Les levures . .</b>	<b>123</b>
<b>Conclusion générale . .</b>	<b>127</b>
<b>Références bibliographiques . .</b>	<b>129</b>
<b>Annexes . .</b>	<b>146</b>

## Remerciements

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

Je tiens à exprimer mes sincères gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont à :

**M. BELLAL M.M.**, Professeur à l'INA de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

**M. ASSAMI M.K.**, Maître de conférences à l'INA, pour avoir accepté d'encadrer ce travail et pour ses précieux conseils.

**M. HAZZIT M.**, Chargé de cours à l'INA pour m'avoir dirigé, conseillé, et encouragé, ainsi que pour sa bonne volonté, sa patience et ses précieux conseils qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail.

**M. FERRADJI A.**, Maître de conférence à l'INA, pour son aide matérielle et d'avoir bien voulu examiner ce travail et être membre du jury.

- **M. BOUSNADJI R.**, Docteur d'Etat et cadre au Ministère de Commerce pour avoir bien voulu examiner ce travail et d'être membre du jury.

Je ne saurai jamais assez remercier toute ma famille, pour les sacrifices et l'amour qu'ils ont témoigné à mon égard.

Je remercie également, M. BENCHABANE A. pour son aide et tous les enseignants du laboratoire de chimie qui m'ont aidé, guidé et encouragé et tous les membres de l'équipe huiles essentielles et de microbiologie du CRD SAIDAL.

Mes remerciements vont également aux responsables du CRD SONATRACH de Boumerdes qui m'ont permis de réaliser le couplage GC/SM.

Mes remerciements vont également à Mina, Mohamed, Baya, Soumia, Karim, Fatima, Mebrouk, Nadia, Lâarbi du département de technologie alimentaire, à Redouane du département de Sciences du sol de l'INA et Mme Fatima du département de botanique de l'INA.

Ma gratitude va à tous mes amis (es) qui m'ont aidé par leur présence et leur amitié, particulièrement : Aïcha, Amirouche, Billal, Boualem, Farid, Fayçal, Hachemi, Kamel, Khalid, Moussa, Mohamed, Sofiane...

## Liste des abréviations

- **ABAP** : 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride
- **AFNOR** : Association Française de Normalisation
- **AG** :Acide gras
- **AOCS** : The American Oil Chemists' Society
- **ATB** : Antibiotique
- **ATCC** : American Type Culture Collection
- **a<sub>w</sub>** : Activité de l'eau
- **BHA** : Butyl Hydroxy Anisol
- **BHT** : Butyl Hydroxy Toluène
- **Ca** : *Candida albicans*
- **CEE** :Comité Economique Européen
- **cl** : Centilitre
- **CG/SM** : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
- **cm** : Centimètre
- **CMB** : Concentration Minimale Bactéricide
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- **CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse
- **CRD** : Centre de recherche et de développement
- **d** : Densité relative à 20°C
- **DL 50** :Dose létale 50 %
- **Ec** : *Escherichia coli*
- **EDTA** :Acide éthylènediaminetétracétique
- **Ef** : *Enterococcus faecium*
- **eV** : Electron volte
- **FID** : Détecteur à ionisation de flamme
- **g** : Gramme
- **Gr** : Grossissement
- **H** : Heure
- **HE** : Huile essentielle
- **INA** : Institut National Agronomique
- **Kg** : Kilogramme
- **Kp** : *Klebsiella pneumoniae*
- **L** : Litre
- **LPS** : Lipopolysaccharides
- **m** : Mètre
- **Meq** : Milliéquivalent
- **mg** :Milligramme



- **MHE** : Masse de l'huile essentielle récupérée
- **ml** : Millilitre
- **mm** : Millimètre
- **mn** : Minute
- **MV**: Masse de la matière végétale
- **N** : Normale
- **n°** : Numéro
- **nm** : Nanomètre
- **Of** : *Origanum floribundum*
- **Pa** : *Pseudomonas aeruginosa*
- **p H** : Potentiel d'hydrogène
- **ppb** : Partie par billion
- **ppm** : Partie par million
- **PS** : Poil sécréteur
- **PT** : Poil tecteur
- **Rdti** : Rendement instantané en huile essentielle
- **RdtHE** : Rendement cumulé en huile essentielle
- **Sa** : *Staphylococcus aureus*
- **Se** : *Staphylococcus epidermidis*
- **Sec** : Seconde
- **SM** : Spectrométrie de Masse
- **TBHQ** : 2-Tertiobutyl-4-hydroxyphénol
- **Td** : *Thymus dreatensis*
- **Tm** : *Thymus munbyanus*
- **Tp** : *Thymus pallescens*
- **tr/mn** : Tour par minute
- **UICPA** : Union internationale de chimie pure et appliquée
- **V** : Volume
- **µL** : Microlitre
- **α** : Alpha
- **β** : Beta
- **γ** : Gamma
- **δ** : Sigma
- **ρ** : Para
- **%** : Pourcentage
- **°** : Degré
- **°C** : Degré Celsius
- **±** : Plus ou moins

## Abstract

Chemical composition of *Thymus dreatensis*, *T. pallescens*, *T. munbyanus* and *Origanum floribundum* restricted to Algeria and the North Africa region was determined. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated by hydrodistillation were also determined. The chemical composition of these oils was analyzed by GC and GC/MS system. Carvacrol (46,9 %), linalool (30,4 %), thymol (37,7 %) and carvacrol (29,6 %) were the main components respectively of *T. pallescens*, *T. dreatensis*, *T. munbyanus* and *O. floribundum*. All essential oils possessed antioxidant activity, but this was dependent on the specific chemical composition and the method employed to determine such activity. The antimicrobial test results showed that the essential oil of *T. pallescens* has the strongest inhibition opposite the tested microorganisms and *Staphylococcus aureus* is the most appreciable microorganism.

Keywords : Essential oils ; Antioxidant activity; Antimicrobial activity ; *Thymus dreatensis* ; *T. pallescens* ; *T. munbyanus* ; *Origanum floribundum* ; Hydrodistillation ; GC and GC/MS system ; Microorganisms.

---

## Résumé

La composition chimique de *Thymus dreatensis*, *T. pallescens*, *T. munbyanus* et *Origanum floribundum* poussant en Algérie et en région Nord africaine a été déterminée. L'activité antioxydante et antimicrobienne des HE extraites par hydrodistillation ont été aussi déterminées.

La composition chimique de ces huiles a été analysée par CPG et CG/SM. Le carvacrol (46,9%), le linalool (30,4 %), le thymol (37,7 %) et le carvacrol (29,6 %) ont été les principaux composants respectivement de *T. pallescens*, *T. dreatensis*, *T. munbyanus* et *O. floribundum*. Toutes les HE possèdent une activité antioxydante, mais celle-ci est en relation directe avec la composition chimique et à la méthode employée pour déterminer chaque activité. Le résultat du test antimicrobien a montré que l'huile essentielle de *T. pallescens* a la plus forte inhibition vis-à-vis des micro-organismes testés et que *Staphylococcus aureus* est le micro-organisme le plus sensible.

**Mots clés** : Huiles essentielles ; Activité antioxydante ; Activité antimicrobienne ; *Thymus dreatensis* ; *T. pallescens* ; *T. munbyanus* ; *Origanum floribundum* ; Hydrodistillation ; CPG et CG/SM ; Micro-organismes.

## Introduction générale

La conservation et la valorisation de la diversité des ressources génétiques des plantes d'un pays supposent d'abord la connaissance précise de ce patrimoine.

Les plantes médicinales et aromatiques demeurent une source inépuisable de substances biologiquement actives. Dans la majorité des pays du Sud, ces plantes constituent une composante fondamentale dans les secteurs de santé et agro-alimentaire.

La dégradation des lipides occasionnée par l'oxygène de l'air est un phénomène inévitable qui entraîne une altération des propriétés sensorielles (goût, odeur et couleur), nutritionnelles et physiques des aliments dans lesquels elle apparaît (**Frankel, 1998**). Il est indispensable pour les industriels de retarder au maximum le 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 difficiles à mettre en oeuvre ou insuffisantes, et l'ajout d'antioxydants dans les formulations, représente une alternative souvent indispensable. Les premiers antioxydants connus étaient issus de produits naturels. Puis les antioxydants de synthèse ont fait leur apparition, en raison de leur efficacité accrue. De nos jours, les composés synthétiques sont critiqués en raison des problèmes qu'ils peuvent engendrer sur la santé. En effet, le BHT, le BHA et le TBHQ sont suspectés d'avoir des effets négatifs sur la santé du consommateur (**Namiki, 1990, Dapkevicius et al., 1998**). 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.

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 (**Friedman et al., 2002**).

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 huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêts comme source potentielle de molécules naturelles bioactives.

Beaucoup de composés naturels, tels que les phénols et les acides organiques ont été considérés dans ce contexte. Beaucoup d'épices, d'herbes et d'extraits possèdent une activité antioxydante et antimicrobienne qui est presque invariablement due à la fraction d'huile essentielle qui est souvent un mélange complexe de différents composés dont certains sont dotés de ces propriétés.

La famille des Lamiacées est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien et antioxydant (**Bouhdib et al., 2003**).

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales, au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique. Les genres *Thymus* et *Origanum* comprennent plusieurs

espèces botaniques réparties sur tout le littoral et mêmes dans les régions internes jusqu'aux zones arides. La majorité des espèces recensées en Algérie sont endémiques. Ces espèces sont très riches en huiles essentielles et sont utilisées en médecine populaire pour leurs propriétés antiseptiques, antidiarrhéiques et antibronchiques (**Bruneton, 1993**).

Les plantes sur lesquelles a porté notre choix sont trois espèces du thym (*Thymus pallescens*, *Thymus munbyanus* et *Thymus dreatensis*) et une espèce d'origan (*Origanum floribundum*) provenant de diverses régions d'Algérie.

Au cours de ce travail, nous essayerons de :

- Localiser les organes sécréteurs des huiles essentielles du thym et d'origan.
- Évaluer le rendement et la cinétique d'extraction.
- Déterminer certaines caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles extraites par hydrodistillation.
- Analyser qualitativement les huiles essentielles par chromatographie phase gazeuse (CPG).
- Analyser quantitativement les essences du thym et de l'origan par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).
- Évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne des différentes essences étudiées.

# Chapitre I : Les huiles essentielles

## Historique

L'utilisation connue des plantes se prolonge sur environ 5000 années, commençant par les civilisations égyptiennes, chinoises, et indiennes antiques.

Les huiles essentielles sont des substances naturelles existant depuis l'antiquité. Les arômes et les parfums furent parmi les premiers signes de la reconnaissance qui marquèrent la vie de l'Homme (**Delaigne, 1930**).

L'importance de ces huiles était fondamentale, elles sont à l'origine de l'industrie des arômes. Bien qu'on connaisse plus de 3000 essences, il n'y en a guère que 150 qui aient actuellement une importance commerciale (**Friedland, 1975**).

## Définition

Huile essentielle ? Il est difficile de donner une seule définition, car « il n'y a pas une réponse mais des réponses à cette question » (**Naves, 1974**). 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 (**Belaiche, 1979**).

D'après **Bernard et al . (1988)**, le nom d'essences ou huiles essentielles désigne les principes volatiles 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.

**Conner, (1993)** 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 (**AFNOR, 2000**). Cette définition est restrictive car elle exclut aussi bien les produits extraits à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé.

**Bruneton (1993, 1999)**, définit les termes les plus couramment utilisés dans ce domaine, tels que :

Pommade florale

C'est un corps gras parfumé obtenu à partir de fleurs, soit par enfleurage à froid, soit par enfleurage à chaud.

### Résinoïde

C'est un 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.

### Absolu

C'est un produit ayant une odeur caractéristique, obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un résinoïde par extraction à l'éthanol et à température ambiante. La solution éthanolique obtenue est généralement refroidie et filtrée dans le but d'éliminer les cires.

### Epices

C'est des produits végétaux naturels ou mélanges de ceux-ci, sans matières étrangères, qui sont utilisés pour donner de la saveur et de l'arôme et pour assaisonner les aliments ; le terme s'applique à la fois au produit entier et au produit en poudre.

### Concrète

C'est un 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 des procédés physiques.

## Propriétés physico-chimiques

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (**Bernard et al., 1988, Bruneton, 1993**). 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 variant 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 soluble dans l'eau.
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques.
- Très altérables, sensible 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.

## Composition chimique

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont poly-moléculaires, (jusqu'à 1000 molécules différentes dans

l'huile essentielle de Rose) (**Belaiche, 1979**). À côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces (**Pibiri, 2006**). Les HE des plantes sont souvent composées d'essences et d'une résine dissoute dans l'essence (**Le Louarn, 1994**).

Ces composés appartiennent à deux familles chimiques bien distinctes à savoir :

- Les composés terpéniques ;
- Les composés aromatiques dérivés de phénylpropane.

D'après **Pibiri (2006)**, la structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène (O), pour quelques groupes fonctionnels azotés (N) ou soufrés (S).

Selon Mailhebiau(1994), Franchomme, Pénéol et *al.*, (1990), cette structure varie en fonction :

- du nombre d'atomes de carbone qui la constitue :
  - Les monoterpènes,
  - Les sesquiterpènes,
  - Rarement les diterpènes .
- du caractère saturé ou insaturé des liaisons,
- de leur agencement : linéaire ou cyclique,
- de la configuration spatiale(forme de chaise, de bateau, de trièdre...),
- de la nature des groupes fonctionnels à savoir :
  - Terpènes :  $R_1-HC=CH-R_2$ ,
  - Alcools terpéniques :  $R-OH$ ,
  - Cétones :  $R_1-CO-R_2$ ,
  - Phénols :  $C_6H_6-OH$ ,
  - Aldéhydes:  $R-CHO$ ,
  - Esters:  $R_1-COO-R_2$ ,
  - Ethers :  $R_1-O-R_2$ .

## Groupes chimiques des HE

---

**Le Louarn (1994)** classe les HE en trois grands groupes : les HE hydrocarbonées, les HE oxygénées et les HE sulfurées.

Les HE hydrocarbonées

Elles contiennent surtout des terpènes ou carbures d'hydrogène, tels le thymène, le terpinène, le cimène, le limonène, les sesquiterpènes, etc. Exemples types : HE de thym, d'origan, de citron, de cyprès.

Les HE oxygénées

Leurs essences sont généralement solides. C'est le cas de l'essence de rose et de menthe.



### Les HE sulfurées

Elles sont présentes dans plusieurs espèces de la famille des Crucifères (choux, moutarde, etc.), mais aussi dans certaines Liliacées (ail, oignon, etc.).

## Localisation des huiles essentielles

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 des infimes quantités d'essence aromatique par l'intermédiaire de poils, poches ou canaux sécréteurs (**Bruneton 1993**). Les genres capables d'élaborer les constituants des huiles essentielles sont répartis dans un nombre de familles limité ; *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae*, ... (**Durvele, 1930, Bruneton, 1999**).

Les teneurs en huiles essentielles sont généralement très faibles, à l'exception de celle du bouton floral de giroflier où le rendement en huile essentielle atteint largement les 15 % (**Makhlouf, 2002**).

## Fonction biologique 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. (**Richard, 1992**). Mais ce qui est probable, c'est que le rôle des HE au niveau du matériel végétal est intimement lié à leur situation.

Par exemple, ces huiles confèrent un rôle répulsif vis-à-vis des prédateurs et attractifs pour les insectes pollinisateurs. Un feuillage renfermant une teneur élevée en essences végétales (Laurier) le protège des herbivores. La présence des HE au niveau des racines, des écorces, du bois, confère à la plante un effet antiseptique vis-à-vis des parasites telluriques.

Certains terpènes linéaires interviennent dans le métabolisme de la plante, ils peuvent être employés comme source énergétique (**Guignard, 1996**).

## 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 (**Pibiri, 2006**).

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

### 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<sub>50</sub> supérieures à 5 g/kg. En ce qui concerne la sarriette et l'origan la toxicité est un plus élevée autour des 1,4 g/kg (donnée observée chez l'animal) (**Bruneton, 1999**). 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) (**Pibiri, 2006**).

### 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 (aiguë 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 (**Pibiri, 2006**).

### Toxicité selon la composition

---

Certains auteurs (**Franchomme et al ., 1990, Mailhebiau, 1994**) 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, la Suisse incluse (**Pibiri, 2006**).

### 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 (**Inouye, 2003**), sont cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois. Par ailleurs, des huiles essentielles de différentes variétés d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines dérivées de cancers (**Sivropoulou et al ., 1996**).

## Utilisation des HE

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 (**Anonyme, 2005**). A cet effet, les HE sont recommandées en usage antibiotique, antiviral, antiseptique, fongicide, cicatrisant, digestif, anti-inflammatoire, sédatif, etc. (**Richard, 1992**).

## En industrie agro-alimentaire

---

Les HE 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 (**Conner, 1993**).

Elles sont également employées comme agents aromatisants naturels. Selon **Bruneton (1993)**, la part des HE dans l'aromatisation ne cesse de croître au dépend des composés aromatiques de synthèse.

## Aromathérapie

---

Dans notre société moderne, la médecine courante, d'orientation allopathique, se trouve confrontée à des problèmes majeurs : l'inefficacité des antibiotiques face à certains germes pathogènes devenus résistants, le manque de substances antivirales, l'augmentation des déficiences immunitaires des individus, le cercle vicieux auquel aboutit la prescription continue de médicaments psychotropes (**Richard, 1992**).

L'aromathérapie propose des solutions alternatives à ces problèmes. 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 HE (**Richard, 1992**). Elles apportent à l'organisme, les concentrés de la nature les plus précieux pour rétablir ou conserver l'équilibre indispensable à la santé (**Anonyme, 2005**).

## Procédés d'extraction des huiles essentielles

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique (**Garnero, 1977**).

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.

### 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.

### Extraction à la vapeur d'eau

---

L'extraction à la vapeur d'eau, connue depuis la plus haute antiquité, transmise par les Arabes et perfectionnée par les Grassois, est un procédé utilisant la vapeur d'eau pour

séparer les substances aromatiques. Ce procédé est considéré comme étant le seul moyen compatible avec un usage médical.

### **Entraînement à la vapeur d'eau**

Ce procédé consiste à récupérer l'HE 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. Les phénomènes intervenants lors de l'entraînement à la vapeur seraient l'osmose et la diffusion libre (**Guenther, 1972**).

### **Hydrodistillation**

Ce mode d'extraction a été proposé par Garnier en 1891, c'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe 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 surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (**Bruneton, 1993**). 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'HE à savoir : hydrolyse, élimination, cyclisation et réarrangement (**Benhabiles, 1995**).

### **Hydrodistillation par micro-ondes sous vide**

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'HE est entraînée dans le mélange isotopique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée. Très rapide et peu consommateur d'énergie, ce procédé fournit un produit de qualité et de quantité supérieure à celle obtenue par l'hydrodistillation (**Bruneton, 1999**).

### **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 dans une étuve. Ce procédé utilisé avec du romarin donne un rendement plus élevé en composés oxygénés que lors de l'entraînement à la vapeur (**Basil et al., 1998**).

### **Extraction distillation 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.

#### **Principe**

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. Cet appareillage, initialement conçu pour l'étude de la bière, par la suite été étendu à un grand nombre d'arômes (**Vermin, 1982**).

### **Fractionnement**

Cette opération de distillation consiste à séparer plusieurs constituants d'un mélange liquide par échange de matière entre une phase vapeur et une phase liquide, au moyen d'une série

de vaporisations et de condensations entre ce liquide et cette vapeur qui chemine à contre courant dans une colonne. Elle permet de séparer des composants de mélanges liquides dans un état de grande pureté (Cicile, 1994, 2002).

## Extraction par le CO<sub>2</sub> à l'état supercritique

---

Ce procédé est basé sur le fait que le CO<sub>2</sub> dans des conditions dites critiques (fortes pressions) présente un pouvoir de dissolution accru vis-à-vis de divers composés tels que les HE, les arômes et les colorants ... (Mayer, 1989).

Cette méthode utilisée d'abord en brasserie pour obtenir des extraits de houblon, semblait a priori intéressante d'une part pour augmenter le rendement d'extraction, d'autre part le CO<sub>2</sub> 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 (Pellerin, 2001).

Grâce aux caractéristiques du CO<sub>2</sub> à l'état supercritique, en particulier celle d'être un solvant à « géométrie variable », nous pouvons donc obtenir à basse pression des extraits dont la composition est de type « huile essentielle », à haute pression des extraits dont la composition est de type « concrète ». Evidemment selon les conditions opératoires, on peut en théorie obtenir tous les extraits intermédiaires (Pellerin, 2001).

## 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 (Garnero, 1996).

### Extraction par solvants fixes

**Enfleurage** : Ce procédé met à profit le caractère liposoluble des composants odorants des végétaux (Bruneton, 1993). Il consiste, dès la récolte de fleurs fraîches, à les intercaler entre des couches de graisse animale qui retenait le parfum. La "pommade" parfumée était lavée à l'alcool qui retenait le parfum. Pour la rose, la fleur d'oranger, l'acacia, le mimosa, l'enfleurage à froid étant insuffisant, on procède ainsi à une immersion dans de la graisse chauffée à 80 °C.

**Macération** : 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 (Blakeway et Salerno, 1987).

### Extraction par solvants volatils

Selon **Banthorpe et Charwood (1972)**, 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. Pour séparer ces composants aromatiques du ballast, deux types d'extraction ont été utilisés :

- **Extraction solide / liquide** : C'est-à-dire l'opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide (la matière à extraire) et une phase liquide (le solvant d'extraction). Elle est réalisable soit par simple contact (à étage unique), l'extraction dans ce cas est souvent incomplète même avec un très bon solvant ; soit par contacts multiples, à co-courants parallèles ou à contre-courant (extraction méthodique), cette dernière est plus économique (**Leybros et Frémeaux, 1990**).
- **Extraction liquide / liquide** : C'est-à-dire l'opération de transfert ou d'échange de matière entre deux phases liquides, la solution et le solvant. L'extraction systématique en continu, utilisée pour extraire un constituant particulier ou pour en éliminer d'autres, en utilisant deux solvants non miscibles à pouvoir dissolvant plus spécifique de chaque groupe (**Moulin et al. , 2002**).

## Analyse des huiles essentielles

Selon la Pharmacopée française et européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants (**Pibiri, 2006**).

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés.

## Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

---

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

La CPG s'est montrée une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une HE, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative (**Paris et Godon, 1979**).

### Principe

En CPG, l'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de l'analyte entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (**Skoog et al. , 2003**).

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé

« rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé (**Tranchant et al ., 1995**).

## Spectrométrie de masse (SM)

---

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

Vu sa capacité à identifier un très grand nombre de composés présents dans le mélange à analyser, elle représente le couplage le plus utilisé dans divers secteurs notamment avec la chromatographie phase gazeuse (**Tranchant, 1982 ; Rouessac et Rouessac, 1995**).

## Le couplage CG/SM

---

La complexité des mélanges à analyser dans des domaines très différents a conduit au développement de techniques de plus en plus sélectives pour permettre la caractérisation de composés souvent présents à l'état de traces. Au cours des vingt dernières années, les avancées obtenues dans ces domaines d'analyse tiennent principalement à deux raisons : dans le domaine de la séparation chromatographique et, en particulier, de la CPG, au développement de colonnes chromatographiques capillaires à très haute résolution ; dans le domaine de la détection, au développement en routine des techniques de couplages, de séparations chromatographiques avec la détection par SM.

La totale maîtrise du couplage chromatographique avec la spectrométrie de masse depuis le début des années 80 et la mise au point de spectromètres de masse tandems commerciaux a permis l'utilisation des propriétés de sélectivité de ces deux techniques pour pousser plus en avant les potentialités analytiques attendues de la combinaison de celles-ci, laissant au couplage CG-SM toute la latitude pour affirmer sa sélectivité pour l'analyse de mélanges complexes(**Afnor, 2000**).

### Principe

Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes (**Pradeau et Cohen, 1992**) :

- Ionisation : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de départ.
  - **Accélération** : les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
  - **Séparation** : les ions seront distribués suivant leur rapport masse / charge.
  - **Détection** : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.





---

# Monographie des plantes étudiées

## Thym

### Historique

---

Le thym a toujours accompagné la vie quotidienne de l'homme à des fins médicaux, cosmétiques et culinaires. Connu par les Hippocrates et Dioscorides il était parmi les premières plantes médicinales dans la région méditerranéenne.

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

L'extrême variabilité et les hybridations interspécifiques, ont rendu la détermination des espèces très délicate (**Quezel et Santa ,1963**).

Environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen (**Jalas, 1971**). A cet effet la région méditerranéenne occidentale semble être le centre d'origine de ce genre.

## Caractéristiques botaniques

### Classification

---

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 (**Bouhidid et al ., 2006**). Elle regroupe entre 200 et 250 genres et entre 3200 et 6500 espèces (**Anon, 2003, Dorman et al. , 2004**).

*Thymus* est l'un des huit genres les plus importants en ce qui concerne le nombre d'espèces chez la famille des Labiatae, bien que le nombre d'espèces de ce genre change selon le point de vue taxonomique ; si nous adoptons un caractère synthétique, il comporte plus de 200 espèces. (**Morales, 1997**).

Selon la classification d'**Engler** en 1924,le thym appartient au :

- **Règne** : Plantae
- **Embranchement** : Spermaphytes
- **Sous embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Magnolipsida
- **Sous classe** : Métachlamydées
- **Ordre** : Tubiflorales
- **Famille** : Lamiacées
- **Sous famille** : Stachyoidea

- **Genre** : *Thymus*

### Description morphologique

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 rocailleux et dans les garrigues.

Les feuilles du thym sont plus au moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice quant à lui, est tubuleux à deux lèvres et la corolle est plus au moins exserte à deux lèvres aussi (**Quezel et Santa, 1963**).

### Localisation et répartition géographique

---

#### Dans le monde

Le thym est distribué dans le vieux continent, sur les côtes du Groenland et dans la région macaronisienne (les canaries, Madère et les Açores).

C'est une plante très répandue dans le nord ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye) ainsi que dans les montagnes d'Ethiopie, les montagnes d'Arabie du sud ouest et la péninsule de 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. (**Jalas, 1971**).

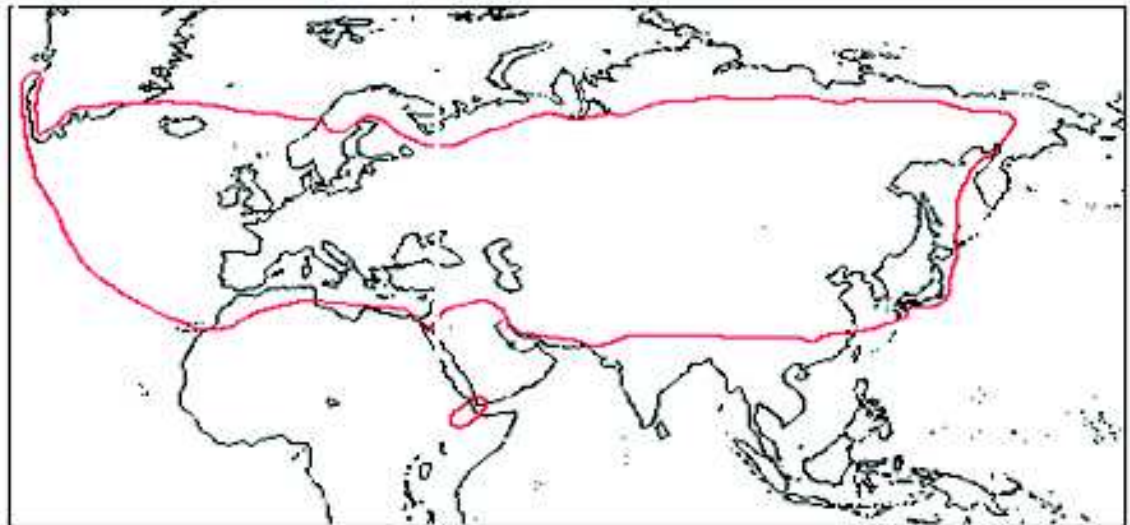


Figure 1: Répartition géographique du thym dans le monde (Stahl-Biskup, 2002)

D'après **Djerrari et Cruzet (1985)**, plus de 27 espèces du genre *Thymus* poussent entre l'Algérie et le Maroc (Tableau 1).

Espèces	Pays	
	Algérie	Maroc
<i>Thymus afer</i>		+
<i>Thymus algeriensis</i>	+	+
<i>Thymus baeticus</i>		+
<i>Thymus bleicherianus</i> P.		+
<i>Thymus broussonetii</i> B.		+
<i>Thymus capitatus</i>	+	
<i>Thymus commutatus</i>	+	
<i>Thymus ciliatus</i> D.		+
<i>Thymus Commutatus</i> B.		+
<i>Thymus dreatensis</i>	+	
<i>Thymus pallescens</i>	+	
<i>Thymus godcreusis</i>		+
<i>Thymus glandulosus</i>	+	+
<i>Thymus gajonni</i>	+	
<i>Thymus herperidium</i>		+
<i>Thymus hartus</i> W.	+	+
<i>Thymus lanceolatus</i>	+	+
<i>Thymus leptobotrys</i> M.		+
<i>Thymus lusitanicus</i> B.		+
<i>Thymus maroccanus</i> B.		+
<i>Thymus manbyanus</i>	+	
<i>Thymus namadicus</i>	+	
<i>Thymus pallidus</i> C.		+
<i>Thymus pseudo-micromeria</i>	+	+
<i>Thymus satursicoides</i> C.		+
<i>Thymus serpyllum</i>		+
<i>Thymus zveris</i>		

Tableau 1 : Espèces du thym poussant en Algérie et au Maroc

### En Algérie

Le genre *Thymus* inclut environ 300 espèces à travers le monde dont 11 sont localisées en Algérie et 9 d'entre elles sont endémiques (**Kabouche et al. , 2005**). Ces espèces sont réparties du Nord algérois à l'Atlas saharien, et du constantinois à l'oranais (Tableau 2).

Tableau 2: Principales localisations géographiques du thym en Algérie

## Huiles essentielles de thym et d'origan

Espèce	Localisation et caractéristique
Thymus pallescens Boiss. et Reuter	Commun dans le tell Endémique Algérien.
Thymus capitatus L.	Très rare dans le sous secteur de l'atlas tellien
Thymus dreatensis Batt.	Très rare dans le sous secteur du tell constantinois et de la petite Kabylie.
Thymus numidicus Poirét	Assez rare dans : Le sous secteur de l'atlas tellien, le secteur du tell constantinois et petite et grande Kabylie.
Thymus guyonii De Noé	Rare dans : Le sous secteur des hauts plateaux Algérois, Oranais et constantinois.
Thymus lanceolatus Desf.	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 (Aumale).
Thymus pallidus Coss	Très rare dans le sous secteur de l'atlas Saharien constantinois.
Thymus glandulosus Lag.	Très rare dans le sous-secteur des hauts plateaux Algérois et Oranais.
Thymus hirtus Willd.	Commun sauf sur le littoral.
Thymus algériensis Boiss. et Reuter	Très commun dans toutes les régions montagneuses et rare ailleurs.
Thymus munbyanus Desf.	Endémique dans le nord du secteur algérois.

(Quezel et Santa, 1963)

## Huile essentielle du thym

L'HE du thym est extraite principalement à partir des feuilles et des sommités fleuries.

La tige fleurie du thym contient en plus de l'HE des flavonoïdes (thymonine, cirsilinéol et 8-méthoxy-cirsilinéol) et des acides- phénols (notamment caféique et rosmarinique), des tanins et une résine (**Haraguchi et al ., 1996**).

Selon la littérature, plus de 84 HE du genre *Thymus* ont été analysées de 1960 à 1989 (**Stahl- Biskup, 1991**).

L'HE 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). D'après **Viaud (1993)**, les résultats de l'analyse chimique des HE du thym ont permis de définir 07 chémotypes, très tranchées (Tableau 3).

**Tableau 3: Les différents chémotypes de l'HE du thym (Viaud, 1993).**

Type du chémotype	Teneur en composés majoritaires	Propriétés médicinales
Chémotype à 1,8-cineole	80 à 90 % de cineole	Décongestionnant broncho-pulmonaire
Chémotype à géraniol	80 à 90 % de géraniol libre estérifié	Antibactérien, antifongique et antiviral
Chémotype à linalool	80 à 90 % de linalool libre estérifié	Antibactérien, antifongique, viricide
Chémotype à terpinéol	80 à 90 % de terpinéol libre estérifié	Hémolytique
Chémotype à thymol	70 % de thymol en été	Anti- infectieux majeur
Chémotype à carvacrol	80 % de carvacrol en été	Antiseptique pulmonaire
Chémotype à thuyanol	50 à 60 % de trans- thuyanol -4 10 à 20 % de terpinéol-4 10 à 20 % de cis-myrcénol-8	Bactéricide, viricide et neurotonique.

## Principales utilisations du thym

Le thym possède un large spectre d'utilisation, 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, conserves et aux sauces.
- Le thym produit un miel distinctif qui commence à trouver des marchés de place en Europe et en Asie.

## Origan

### Historique et origine

L'origan a toujours joué un rôle important dans nos vies quotidiennes. Elle est employée en médecine traditionnelle et beaucoup d'autres utilisations.

Plante mellifère vivace, pousse de préférence sur les talus ensoleillés des pays du bassin méditerranéen (**Richard, 1992**).

Le genre *Origanum* comporte plusieurs espèces aromatiques de la famille des Labiées, il est originaire du Sud Est méditerranéen et d'Asie occidentale (**Vokou et al ., 1993**).

Le nom origan dérive de deux mots grec ; **Oros** : montagne ou colline et **Ganos** : ornement, parce que cette plante préfère une altitude plus élevée dans le climat méditerranéen.

## Caractéristiques botaniques

---

### Classification

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

Selon la classification d'**Engler** en 1924, l'origan appartient au :

- **Règne** : Plantae
- **Embranchement** : Spermaphytes
- **Sous embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Magnolipsida
- **Sous classe** : Métachlamydées
- **Ordre** : Tubiflorales
- **Famille** : Labiacées
- **Sous famille** : Stachyoideae
- **Genre** : *Origanum*

### Description morphologique

L'origan est une plante herbacée ou sous-ligneuse à la base. Haut de 30 à 90 cm, il représente des tiges carrées portant une quarantaine de branches à feuilles vert foncé, petites et ovales. Les inflorescences sont en épis, eux-mêmes réunis en inflorescences composées (**Richard, 1992**).

Le calice de l'origan est tubuleux à cinq dents courtes, bilabié ou non. La corolle quant à elle est blanche, rosée ou bien violette (**Quezel et Santa, 1963**).

## Répartition géographique

---

### Dans le monde

L'origan pousse surtout dans les pays méditerranéens, notamment au Maghreb, c'est le cas par exemple de l'*Origanum glandulosum* et de l'*Origanum floribundum*. Cette plante vivace pousse également dans de nombreux pays d'Europe et d'Asie, notamment en Chine et en Inde (**Ruberto et al., 2002**). La figure 2 représente la répartition de l'origan dans le monde.

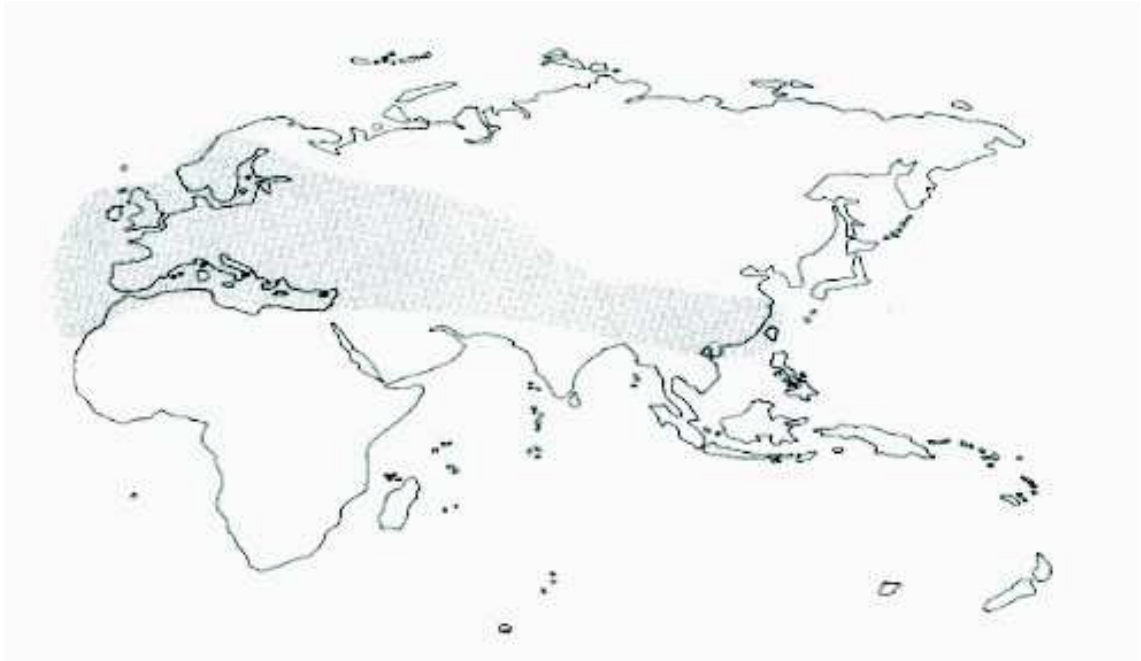


Figure 2 : Répartition géographique de l'origan dans le monde (Pignatti, 1982)

### En Algérie

L'origan est une plante répandue en Algérie, elle est représentée par deux espèces : *Origanum glandulosum* et *Origanum floribundum*. Cette dernière est d'ailleurs une espèce endémique algérienne (Quezel et Santa, 1963). Le Tableau 4 indique la localisation des deux espèces.

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

Espèces	Localisation et caractéristiques
<i>Origanum glandulosum</i> Desf.	Commune dans tout le Tell. Endémique Algéro-Tunisienne. Pousse dans les garrigues et broussailles.
<i>Origanum floribundum</i> Mumby	Pousse en pâturage et surtout en montagne. Espèce rare dans le sous secteur du littoral et le secteur de Kabylie. Endémique d'Algérie.

### Huile essentielle d'origan

Tous les origans renferment en quantité variable une huile essentielle fortement aromatique (Garland, 1980). En moyenne, on extrait environ 1,8 % d'HE à partir des feuilles et des sommités fleuries. Cependant, la qualité et la quantité de l'huile extraite varient selon la génétique de la plante, stade végétatif, les procédés d'extraction et surtout les conditions de l'environnement (Padulosi, 1997).

Le carvacrol est généralement le composé majoritaire de l'HE d'origan (35 à 74 %) (Ultee et al., 1999, Azoudj, 1999), mais dans certains cas le thymol (isomère du carvacrol) l'emporte (Ruberto et al., 2002, Chikhoun, 2004, Fadli et Kessi, 2005).

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de plusieurs espèces d'origan a permis d'identifier les composés majoritaires pour chaque échantillon analysé. Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau 5.

**Tableau 5 : Principaux composés de certaines espèces d'origan**

Principaux Composés	Espèces	Références
Terpinène-4-ol	<i>Origanum majorana</i>	Oussalah <sup>(1)</sup> et al., 2007
Carvacrol et/ou thymol	<i>Origanum hirtum</i> <i>Origanum onites</i>	Kokkini et Vokou, 1989 Kokkini et al. , 1991 Vokou et al. ,1988 et 1993 Ruberto et al. ,1993.
Sesquiterpènes	<i>Origanum vulgare</i>	Lawrence et al., 1984
Carvacrol et thymol □ -Cymène, γ-Terpinene	<i>Origanum floridundum</i>	Aggoune et Harfi, 2006
Carvacrol et thymol	<i>Origanum virens</i>	Hohmann, 1968
Carvacrol et γ-terpinène	<i>Origanum compactum</i>	Oussalah <sup>(1)</sup> et al., 2007

## Principales utilisations de l'origan

---

### Utilisation comme épice

Différentes parties de la plante (feuilles, sommités fleuries huiles essentielles) sont actuellement employées en industrie alimentaire en tant qu'épices. Elle est considérée comme étant l'une des épices les plus répandues dans la région méditerranéenne (**Carmo et al. , 1989 ; Baser et al ., 1992, 1993**).

### Utilisation en médecine traditionnelle

L'huile essentielle d'origan possède un effet antiseptique, est légèrement tonique et digestive. Elle provoque la menstruation, apaise les nerfs, soulage les maux de tête et de dents, elle aide aussi à lutter contre les insomnies.

L'origan est aussi un anti-inflammatoire, antispasmodique expectorant, diurétique et sudorifique. C'est un bon stimulant de l'appareil digestif, il est particulièrement utile dans diverses affections des voies respiratoires (Bronchique, trachéo-bronchite) elle calme la toux en favorisant l'expectoration.



# Chapitre III : Oxydation des lipides et antioxydants

## 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 nécessite que la présence de l'oxygène atmosphérique (**Castera-Rossignol et Bosque, 1994**).

Les premiers produits instables sont des hydroperoxydes dont la structure va dépendre de la nature des acides gras attaqués. Les radicaux alcooxyles 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 flaveur caractéristique « rance » modifiant ainsi la qualité marchande du produit et conditionne directement sa durée de vie (**Donelli et Robinson, 1995, Crapiste et al. , 1999, Kazuhisa, 2001, Judde, 2004**).

Pour limiter ces dégâts, la présence de produits à effet ralentisseurs (chélateurs de métaux, absorbeurs d'oxygène ...) de molécules dites antioxydantes serait indispensable (**Pascal, 1978**).

## Mécanismes généraux de l'oxydation des lipides

D'après **Eymard (2003)**, l'oxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs :

- 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.

D'une manière générale, un corps gras peut subir trois grands types d'altération :

- Oxydation : l'oxygène de l'air est dans ce cas le seul paramètre nécessaire et indispensable à l'initiation des réactions de dégradation.
- Hydrolyse chimique ou enzymatique qui conduit à la formation de glycérides partiels et d'acides gras libres.
- Altération thermique : chauffage pour des températures supérieures à 100 °C voir 150 °C, conduit à la formation de polymères, de composés cycliques ou isomérisés.

## Auto-oxydation

L'oxydation des lipides est une réaction auto-catalytique. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes (**Figure 3**). Une première réaction produit un radical libre par élimination d'un hydrogène de l'acide gras (*initiation*). Puis les réactions s'enchaînent pour produire plusieurs radicaux libres (*propagation*) qui se combinent pour former des composés non radicalaires (*terminaison*).

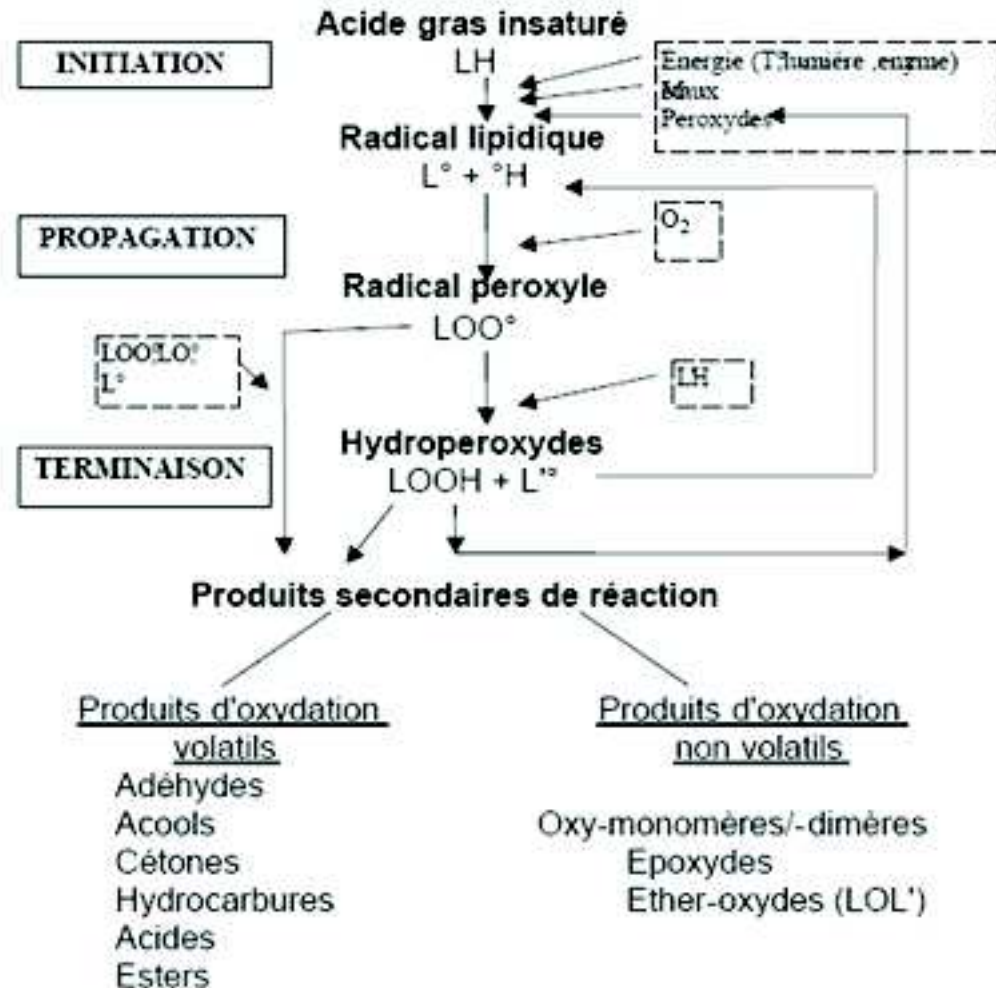


Figure 3: Schéma général de l'oxydation des lipides (Eymard, 2003)

### Mécanisme réactionnel de l'oxydation des lipides

La cinétique de la réaction d'oxydation suit une courbe exponentielle croissante (**figure 4**), elle comporte trois phases distinctes (**Eymard, 2003**) :

#### Phase d'initiation

En présence d'un initiateur (I), les lipides insaturés (RH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre de lipide ( $R^\bullet$ ) (radical, lipoyle).



Ce mode d'initiation, favorisé par une élévation de température, peut être produit par 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.

### Phase de propagation

Les radicaux libres formés fixent l'oxygène moléculaire et forment des radicaux libres peroxydes instables (2) qui peuvent réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras pour former des hydroperoxydes (3)



Cette étape se traduit aussi par l'évolution des hydroperoxydes en composés secondaires d'oxydation, par deux voies principales (**Judde, 2004**) :

- une voie dite de scission, conduisant par coupure à la libération de composés volatils, notamment aldéhydiques, responsables des flaveurs de rance, caractérisés par un seuil de détection très faible ;
- une voie dite de remaniement, conduisant suite à différents types de pontage intra ou inter-acides gras à l'apparition d'acides gras oxydés, de triglycérides oxydés. A ce stade dit de rancissement, la flaveur de rance est bien entendu perceptible, et peut être accompagnée par d'autres conséquences d'ordres fonctionnels (aspect, couleur, texture) et d'ordre physiologique (altération des acides gras essentiels et les vitamines liposolubles).

### Phase de terminaison

Les radicaux formés réagissent entre eux pour conduire à un produit qui n'est pas un radical libre (4, 5, 6).



Les hydroperoxydes peuvent également se décomposer par scission homolytique de la liaison O-O pour former un radical alcoyl et un radical hydroxyl. 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 hydroxyl ou une molécule d'oxygène générant ainsi des hydrocarbures, des alcools et d'autres hydroperoxydes. Le radical vinyl peut réagir avec un radical hydroxyl, un radical hydrogène ou l'oxygène moléculaire pour générer des aldéhydes et des hydrocarbures.

### 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 (Hultin, 1992). Les photosensibilisateurs (Sens) absorbent l'énergie lumineuse et passent à l'état triplet excité ( $\text{Sens}^3$ ) (Hultin, 1994). Les photosensibilisateurs interviennent dans l'oxydation des lipides selon deux types de mécanismes (Frankel, 1998).

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 (7).



Selon le second mécanisme, les molécules photosensibles de type II, telles que la chlorophylle et l'érythrosine, réagissent dans leur état excité ( $\text{Sens}^3$ ) avec l'oxygène triplet (8) auquel elles transfèrent leur énergie pour donner de l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ).



L'oxygène singulet ainsi formé est très électrophile et peut réagir directement sur un acide gras insaturé (RH) formant ainsi un hydroperoxyde ROOH (9).



Par la suite interviennent les réactions radicalaires en chaîne de l'auto oxydation. Les hydroperoxydes ainsi formés sont différents de ceux formés par autooxydation (Frankel, 1998).

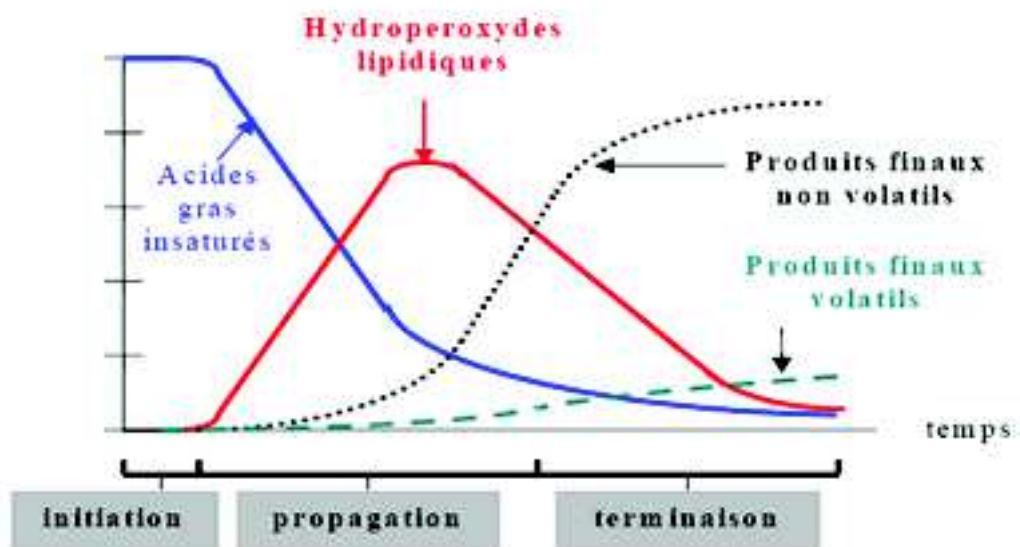


Figure 4: Représentation simplifiée de la cinétique d'oxydation des acides gras insaturés d'après Judde (2004)

## 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

(Hultin, 1994). 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 5**). La cyclooxygénase est une lipoxygénase qui incorpore deux molécules d'oxygène au niveau d'un acide gras pour former des hydroperoxydes spécifiques (Eymard , 2003).

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 (Frankel, 1998).

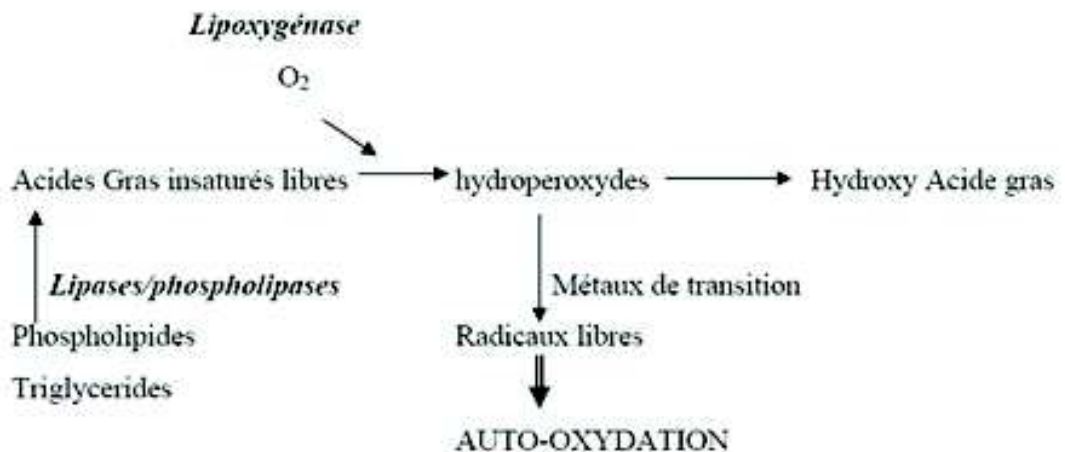


Figure 5: Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique (German et Kinsella, 1985)

## 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 (Hsieh et Kinsella, 1989, Hultin, 1994, Frankel, 1998).

### 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 (Eymard , 2003).

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. 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.

### 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 (**Love, 1980**). 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 (**Kanner et al., 1987**).

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 (**Frankel, 1998**).

### 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, du pH, de l'activité de l'eau et de la pression partielle en oxygène.

#### 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 (**Eymard, 2003**).

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. (**Khayat et Schwall, 1983**).

Au contraire, la congélation est un bon moyen pour augmenter la durée de conservation des produits (**Genot, 2000**), car les vitesses d'oxydations des lipides sont notablement réduites à faibles températures. Lors du stockage à l'état congelé, il est nécessaire d'atteindre des températures de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  pour arrêter complètement l'oxydation, car à une température de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  la formation de peroxydes reste possible (**Ke et al., 1977**).

#### Le pH

Le pH influence le déroulement de l'oxydation par le biais de plusieurs mécanismes (**Genot et al. , 2003**). 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) ou antioxydantes (acide ascorbique par exemple) 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 sont élevée (**Eymard , 2003**).

### L'activité de l'eau ( $A_w$ )

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 solvatation des ions et des radicaux libres et à son activité chimique.

Par solvatation, 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 (**Eymard , 2003**).

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 (**Frankel, 1998**).

### 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 (**Eymard , 2003**).

## Les antioxydants

Lors de la confrontation à une problématique d'oxydation, l'ambition consiste à retarder les premières réactions d'oxydation (allonger la phase d'initiation) mais en aucun cas à supprimer la réaction d'oxydation, ce qui ne pourrait se concevoir qu'en absence totale d'oxygène.

Les bonnes pratiques de fabrication apportent plusieurs possibilités d'actions en ce sens :

- pour minimiser l'apport énergétique (température, lumière) en optimisant les conditions de stockage des matières premières et des produits finis ;
- pour réduire le contact avec l'oxygène, en optimisant les étapes du procédé comportant une agitation et en employant les emballages actifs ;

- pour réduire la présence des métaux pro-oxydants, en introduisant cette spécificité dans les cahiers de charges (matières premières) et en veillant à identifier les étapes du procédé impliquant un matériel non inoxydable ;
- et enfin, utiliser les antioxydants dans des conditions optimales.

### Définition

---

Les antioxydants sont des substances qui, ajoutées à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, sont capables de supprimer, retarder ou empêcher les processus d'oxydation en augmentant le temps au bout duquel il y a une altération décelable du produit (**Gunstone et Norris, 1983**).

### Classement des antioxydants

---

Ils sont classés selon leurs mécanismes d'action et selon leurs origines.

#### En fonction de leurs mécanismes d'action

##### 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 et 11).



(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), gallate de propyl appartiennent à cette classe d'antioxydants (**Lampi et al. , 1999, Kortenska et al. , 2002**). L'α-tocophérol naturel ou de synthèse est l'antioxydant le plus utilisé. Les tocophérols existent naturellement sous forme de quatre isomères : **α, β, δ, γ**. L'efficacité d'un antioxydant peut être augmentée par l'utilisation d'un mélange des isomères du tocophérol (**Alexa Ohm, 2005**).

Parmi les extraits naturels qui sont susceptibles d'être utilisés industriellement, les extraits de romarin (*Rosemarinus officinalis*), la sauge (*Salvia officinalis*) et l'origan possèdent une activité antioxydante caractérisée par la capacité à inhiber les radicaux libres (**Basaga et al. , 1997, Varelzsis et al. , 1997, Madsen et al. , 1999**). Les molécules responsables de cette activité sont des molécules phénoliques et les acides carnosique et romarinique et carnosol.

##### Les antioxydants de type II

Ce type d'antioxydants 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 (**Gunstone, Norris, 1983, Chazan et Szulc, 1987**). De même, des chitosans, polymères constitutifs des carapaces de crabes, ont montré une activité antioxydante sur la chair cuite de Hareng



(*Clupea harengus*) conservée 12 jours à 4°C. Cette activité antioxydante est attribuée à la propriété de ces biopolymères à former des complexes avec les métaux de transition (Kamil et al., 2002).

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 % (Decker et Xu, 1998).

D'après Roeding-Penman et Gordon (1998), 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.

### 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 CO<sub>2</sub>), méthode efficace mais peu utilisée (Eymard, 2003).

### 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. Parmi eux se trouvent : les acides lactiques, tartriques et orthophosphoriques et leurs sels de sodium, potassium ou calcium.

L'efficacité des antioxydants peut être augmentée par l'utilisation d'un mélange d'antioxydant 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 (Frankel, 1998).

### Autres types d'antioxydants

Certains composés protéiques possèdent une activité antioxydante. C'est le cas par exemple de la carnosine (Kansci et al., 1997), des concentrés protéiques obtenus à partir du lait. Ils sont susceptibles de complexer le fer.

### En fonction de leurs origines

Les antioxydants sont classés en grandes familles à savoir :

### Les antioxydants de synthèse

Ce sont des molécules stériquement encombrées. Parmi ces antioxydants :

- Le BHT (Butyl Hydroxy Toluène)
- Substance liposoluble largement utilisée depuis longtemps pour stabiliser les matières grasses. Son utilisation est remise en cause actuellement en raison de risques toxicologiques (Morelle, 1988, Martel et Pescal, 1992).
- Le BHA (Butyl Hydroxy Anisol)
- C'est un mélange de deux isomères de position (3-BHA, 2-BHA), bien qu'il soit moins efficace que le BHT, cet antioxydant est largement utilisé et apprécié pour sa grande stabilité vis-à-vis de la chaleur. Son utilisation est aussi en discussion en raison de sa forte toxicité (Morelle, 1988, Martel et Pescal, 1992).

- Le TBHQ (2-Tertiobutyl-4-hydroxyphénol)
- Il est moins soluble dans les graisses mais plus efficace que les deux antioxydants cités précédemment (**Paquot et Cuvier, 1979, Tomopoulos et Grigoropoulou, 1982**). Il est autorisé aux Etats-Unies à la dose de 0,05 mg/Kg mais il est interdit par CEE car suspecté de génotoxicité (**Chevolleau et al. , 1992**)
- Acide gallique et ses esters
- Bien qu'il possède une activité antioxydante plus importante que ses esters, il est moins utilisé dans l'industrie agroalimentaire. Les gallates de propyle (E 310), d'octyle (E 311) et de dodécyle (E 312) sont autorisés dans les huiles, margarines et beurres à des teneurs de 100 mg/ Kg (**Castera-Rossignol et Bosque, 1994**). Ils sont utilisés pour protéger les graisses animales, en synergie avec le BHA pour les huiles végétales et sont nettement plus efficaces que le BHA et le BHT sur les saindoux (**Dziedzic et al. , 1986, Chazen et Szulc, 1987, Chevolleau et al. , 1992**).

### Les antioxydants naturels

Ils sont de plus en plus préférés aux produits de synthèse. De nombreuses études portent sur la recherche de molécules naturelles ayant des propriétés antioxydantes. Ainsi les sources d'antioxydants naturels sont nombreuses et variées : concentrés de tocophérols, extraits de plantes, huiles essentielles, poudre de miel, extraits de fruits, de légumes, de thé... (**Pszczola, 2001, Dorman et al. , 2004, Tepe et al. , 2005, Kumaran et Karunakaran, 2006**).

Parmi les antioxydants naturels, les tocophérols et tocotriénols, ils sont largement employés et ont fait l'objet de nombreuses études (**Frankel, 1998, Alexa Ohm, 2005**). Ils sont autorisés en alimentation humaine sous forme d'extraits naturels ou sous forme d'isomères de synthèse. Leur grande solubilité dans les huiles et les graisses leur confère un intérêt particulier et ils sont capable d'interrompe la réaction en chaîne en agissant comme donneurs d'hydrogène vis-à-vis d'un radical hydroperoxyde. L'activité relative des tocophérols dépend du nombre de groupement méthyles sur le cycle aromatique (**Chazen et Szulc, 1987, Chevolleau et al. , 1992**).

L'acide ascorbique est considéré comme un synergiste car, en se transformant en acide dihydro-ascorbique, il permet d'hydrogéner les antioxygènes phénoliques oxydés par les peroxydes et il complexifie les métaux pro-oxydants (**Richard, 1992**). C'est un très bon synergiste de l' $\alpha$ -tocophérol (**Cillard et Cillard, 1987**). Cependant sa solubilisation dans les huiles semble difficile. Son pouvoir antioxydant est supérieur à celui du BHA, du BHT et celui des extraits du romarin (**Han et al. , 1990, Chevolleau et al. , 1992**).

Les autres antioxydants d'origine naturelle sont des produits extraits de plantes et en particulier d'épices : romarin, cumin, thym, origan, clou de girofle, sauge (**Chevolleau, 1990, Vardar-Unlu et al. , 2003, Skerget et al. , 2005, Lee et al. , 2005, Küçük et al. , 2007, Tomaino et al. , 2005**). 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 par la présence de composés phénoliques (thymol, carvacrol, ...) (**Das et Preira, 1990, Chevolleau, 1990, Pokorny, 1991, Schwarz et Ternes, 1992, Crapiste et al. , 1999, Tepe et al. , 2006**).

## Mesure du degré d'oxydation des lipides

Lors des études de cinétique d'oxydation des lipides, l'état d'avancement de la réaction peut être évalué par la mise en évidence de la disparition des substrats de l'oxydation.

Afin de déterminer l'état d'oxydation d'un aliment il est nécessaire de mesurer simultanément les quantités des produits primaires et secondaires résultant de l'oxydation des lipides. Une grande variété de méthodes est disponible en fonction de l'information et de la précision recherchées et du substrat étudié (**Dobarganes, 2002**). Seules les plus fréquemment rencontrées dans les études portant sur l'oxydation des lipides de poissons sont présentées.

### Analyse des substrats de l'oxydation

---

#### Mesure de la consommation d'oxygène

L'étude de la consommation d'oxygène permet de suivre les phases d'initiation et de propagation de la réaction. Les méthodes de mesure sont manométriques (mesure de la pression partielle en oxygène) (**Drozdowski et Szukalska, 1987**), polarographique (mesure de la consommation d'oxygène) (**Sims et Fioritti, 1980, Genot et al., 1994**), gravimétrique, par mesure de l'augmentation du poids consécutive à la fixation d'oxygène sur les acides gras (**Garcia-Masia et al., 1993**) et chromatographiques (**Eymard, 2003**).

Ce type d'analyse est employé pour déterminer les cinétiques d'oxydation des lipides en système modèle pour des tests accéléré d'oxydation ou dans le cas de conservation d'échantillons en emballage étanche. Mais il n'est pas utilisé pour déterminer les degrés d'oxydation d'un produit (**Eymard, 2003**).

#### Dosage des acides gras non oxydés résiduels

La cinétique de disparition d'un ou plusieurs acides gras peut être étudiée. L'analyse des acides gras est réalisée après extraction des lipides, méthylation des acides gras et chromatographie en phase gazeuse. La difficulté consiste à extraire quantitativement la matière grasse et à minimiser les pertes au niveau des réactions de méthanolyse (**Berset et Cuvelier, 1996**).

### Mesure des produits primaires

---

Les produits primaires de l'oxydation des lipides peuvent être analysées à l'aide de nombreuses techniques présentant de grandes différences au niveau de leur sensibilité, leur facilité d'utilisation, et la nature de la matrice. Si certaines techniques fonctionnent sur des systèmes « simples », comme des huiles, elles ne sont pas forcément adaptées à des systèmes plus complexes tels que le poisson et ses produits transformés (**Eymard, 2003**).

#### Détermination des diènes conjugués

Les produits primaires de l'oxydation des lipides contenant des doubles liaisons conjuguées peuvent être quantifiés par spectrométrie UV (**Klein, 1970, Corongiu et Banni, 1994**). En effet, l'oxydation des acides gras polyinsaturés s'accompagne d'un déplacement des doubles liaisons qui passent de la position malonique à la position conjuguée. Les diènes

conjugués absorbent à 232-233 nm et les triènes conjugués à 268 nm, ils peuvent être déterminés par mesure de l'absorbance à ces longueurs d'onde. Cette méthode est rapide une fois les lipides du produit à analyser extraits, mais peu spécifique (**Gray, 1978**).

### Dosage des hydroperoxydes

Les hydroperoxydes sont des produits intermédiaires instables qui sont rapidement dégradés pour donner des composés hydroxylés et carbonylés. Les concentrations en hydroperoxydes mesurées correspondent en fait à la différence entre formation et décomposition des peroxydes. Les concentrations en hydroperoxydes peuvent être déterminées à l'aide de nombreuses méthodes à adapter en fonction du substrat étudié (**Eymard, 2003**).

Deux groupes de méthodes peuvent être distingués : Les méthodes analytiques permettent de déterminer la concentration en hydroperoxydes et les techniques chromatographiques permettant d'identifier et de quantifier la nature et les teneurs en hydroperoxydes spécifiques (**Dobarganes et al., 2002**).

### Méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques comme la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à la détection par chemiluminescence (**Koskas et al., 1983 ; Yang et al., 1991**) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG) (**Van Kuijk et al., 1990**) ou couplée à la spectrométrie de masse et des méthodes spectroscopiques comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) (**Frankel, 1990**) et infra rouge (IR) (**Sergent et al., 1993 ; Ruiz et al., 2001**) permettent de caractériser les hydroperoxydes dans les systèmes biologiques. Ces techniques sont reproductibles et sensibles mais complexes et inadaptées à des analyses de routine.

### Méthodes analytiques

Les méthodes analytiques les plus utilisées pour déterminer les teneurs en hydroperoxydes sont les méthodes iodométriques (**Lea, 1946, AOCS, 1989**) et colorimétriques (**Jiang et al., 1992, Shanta et Decker, 1994, Wolff, 1994**).

## Mesure des produits secondaires

---

### Dosage des composés aldéhydiques

La nature des aldéhydes et leurs proportions relatives dépendent beaucoup de l'acide gras oxydé. Deux méthodes colorimétriques sont employées couramment pour les doser : l'indice de p-anisidine et le test à l'acide thiobarbiturique.

Ce test est spécifique pour les aldéhydes conjugués (**Judde, 2004**). La détermination de cet indice repose sur le principe qu'en milieu acétique la p-anisidine donne un complexe coloré en jaune avec des diénals conjugués.

Ce test est utilisé pour déterminer les formes aldéhydiques apparaissant à partir des acides gras comportant en moins trois doubles liaisons (**Judde, 2004**). Son principe repose sur la formation d'un complexe coloré rose résultant de la réaction entre une molécule de malonaldéhyde et deux molécules d'acide 2-thiobarbiturique. Le complexe coloré formé absorbe à 532-535 nm.

### Dosage des composés volatils

L'analyse des composés volatils peut être réalisée par les techniques de l'espace de tête statique ou dynamique couplé à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (**Medina et al ., 1999**).

L'analyse des composés volatils par espace de tête statique comporte trois étapes :

- chauffage modéré de l'échantillon placé dans un récipient scellé jusqu'à ce que les composés volatils diffusent dans la phase gazeuse et qu'un état d'équilibre entre les deux phases soit atteint ;
- prélèvement et injection de la phase gazeuse ;
- séparation des composés en chromatographie en phase gazeuse

L'analyse des composés volatils par espace de tête dynamique comporte quatre étapes :

- l'extraction des composés volatils par un balayage de l'échantillon par un flux de gaz inerte (azote) ;
- le piégeage des composés volatils sur un absorbant de type Tenax ;
- la désorption à haute température des composés volatils suivie d'une cryofocalisation à l'aide d'azote liquide (-120 °C) dans une interface capillaire.
- l'injection des volatils, sur une colonne capillaire d'un chromatographe en phase gazeuse afin de les séparer. Les composés sont ensuite identifiés par spectrométrie de masse en sortie de chromatographie et quantifiés par SM soit par un détecteur FID.

### Evaluation sensorielle

---

Les mauvaises odeurs traduisent les altérations biochimiques d'un produit et sont souvent de très bons indicateurs d'altération (**Jacobsen, 1999**). L'évaluation sensorielle est souvent considérée comme une bonne méthode d'évaluation d'oxydation des produits. En général, une élévation du niveau de l'oxydation se traduit par une modification de l'odeur ou de l'arôme du produit. De nouvelles notes odorantes apparaissent parmi lesquelles les odeurs qualifiées de rance.

Cependant, ce type d'analyse est lourd à mettre en oeuvre car il nécessite des locaux appropriés et surtout de constituer un jury d'évaluateurs sensoriels entraînés capables de qualifier et quantifier les odeurs et les goûts perçus.

L'analyse sensorielle permet de détecter et d'identifier des odeurs résultant des dégradations lipidiques difficilement mesurables par des méthodes chimiques (**Frankel, 1998**).

### Tests d'efficacité des antioxydants

---

Pour mesurer l'efficacité d'un antioxydant, deux approches sont disponibles (**Judde, 2004 et Rolland, 2004**) à savoir :

- La mise en œuvre d'un test de vieillissement en conditions normales de stockage : parfaitement représentatif. Ce type de test est long et incompatible avec les contraintes de développement du produit.
- La mise en place d'un test accéléré, pour « *gagner* » du temps lors du développement de produits. Plusieurs types de tests accélérés peuvent être envisagés :

- Des tests très modélisés, citons à titre d'exemple : le test de DPPH, le test de cooxydation au  $\beta$ -carotène, et plus récemment mis au point, le test ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*).
- Des tests d'oxydabilités accélérée en utilisant l'appareil « Rancimat » (ISO 6886), Oxydograph, Oxipres ou l'emploi d'une enceinte thermostatée.

## Conclusion

---

L'oxydation des lipides est un phénomène complexe, qui met en jeu des espèces très réactives et très labiles, ce qui rend son étude difficile.

Cependant, la connaissance des propriétés des corps gras et la maîtrise du procédé et de l'environnement général, permettent d'agir, le plus en amont possible, pour retarder dans le temps l'apparition des premiers signes de l'oxydation.

# Chapitre IV : L'activité antimicrobienne des HE

## Historique

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 (**De Billerbeck, 2000**), et elle est naissante pour traiter la qualité de l'air dans les bâtiments (**Pibiri et al ., 2001**).

## Activité antibactérienne

### Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des 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 (**Hulin et al ., 1998**).

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 agent 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 (**Davidson et Parish, 1989**).

## 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 les études suivantes ont montré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des *propriétés bactéricides* (Kunle et al., 2003, Carson et Riley, 1995, Lambert et al., 2001, Walsh et al., 2003) et *fongicides* (Hammer et al., 2003).

Plus spécifiquement, plusieurs études ont montré l'apparition de fuites d'ions potassium  $K^+$  de cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec du Tea-tree (*Melaleuca alternifolia*). Il s'agit de la toute première indication de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Des composés isolés tels le thymol et le carvacrol rendent la membrane des bactéries perméable, prémices de leur mort (Helander et al., 1998; Lambert et al., 2001). La faculté de perturber la perméabilité de la cellule membranaire, accompagnée de la perte de l'osmose chimique sont bien la preuve d'une activité létale de certaines huiles essentielles (Cox et al., 2000).

Une revue des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) pour 4 variétés de thym portant sur 14 souches bactériennes (dont *Staphylococcus aureus*) a montrée que dans la majorité des expériences, les valeurs des CMI sont identiques aux CMB. Ceci indique que les huiles essentielles incriminées sont bactéricides (Cosentino et al., 1999).

## 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 (Hermal, 1993). 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 (Pibiri, 2006).

## 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 (Hermal, 1993), et les mélanges en bouillon nutritif, l'activité biocide (Sarbach, 1962). Mais des études récentes se sont affranchies de la méthodologie et des essais gélosés peuvent aussi bien démontrer des effets biocides (Sivropoulou et al., 1996).

### 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.

### 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 (**Lahlou, 2004**).

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 (**Griffin et al., 1999**). 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 (**Dorman et Deans, 2000**).

Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont des *phénols* (thymol, carvacrol et eugénol) des *alcools*, ( $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), des *aldéhydes*, des *cétones* et plus rarement des *terpènes* (**Cosentino et al., 1999; Dorman et Deans, 2000, Valero et Salmeron, 2003**).

### 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 :

selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle, soit liquide, solide ou gazeux,

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 (**Zaika, 1988; Smith et Navilliat, 1997; Mann et Markham, 1998; Lahlou, 2004, Arnal-Schnebel et al., 2004, Lin et al., 2005, Singh et al., 2006**).

## Aromatogramme

« L'aromatogramme est à la phytothérapie ce que l'antibiogramme décrit par la pharmacopée française des antibiotiques est à la médecine ». Cette transposition due au Dr Girault dès 1971, est décrite dans le tome III du Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie (**Belaiche, 1979**).

L'aromatogramme est basée 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 (**Fauchère et Avril, 2002**). 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 6).

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 uniformément ensemencée 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 (**Fauchère et Avril, 2002**).

Cette méthode utilisée par certains auteurs (**Deans et Ritchie, 1987; Zaika, 1988 ; Carson et Riley, 1995; Pattnaik, Subramanyam et al ., 1996; Sivropoulou, et al. , 1996; Smith-Palmer et al. , 1998; Lis-Balchin et al., 2000; Burt et Reinders, 2003; Faleiro et al ., 2003**).

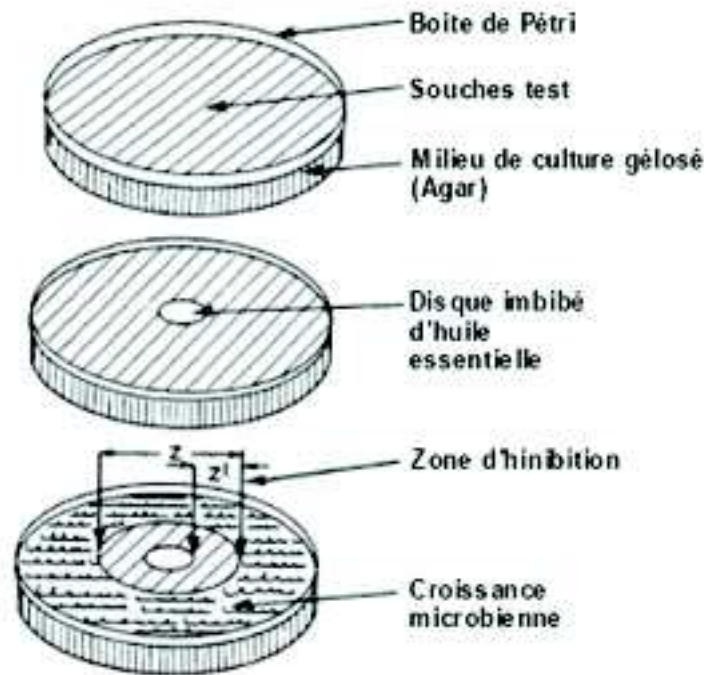


Figure 6: Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988)

### Microatmosphères

Dérivé 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 gélifié (Figure 7).

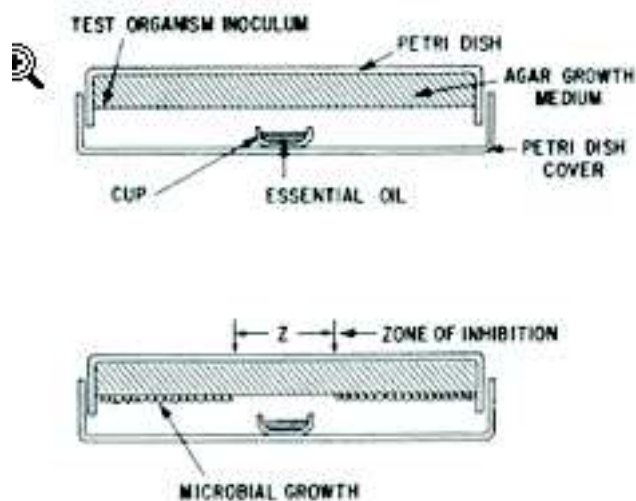


Figure 7: Illustration de la méthode des microatmosphères (Zaika, 1988)

Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse sont encore peu nombreux (**Sarbach, 1962; Didry et al., 1993; De Billerbeck, 2000; Pibiri et al., 2001**).

### Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des HE

---

Selon **Hulin et al. (1998)**, les facteurs influençant l'activité antimicrobienne des HE sont :

#### Effet de la température

**Moleyar et Narasimham (1992)**, 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.

**Bowles et al. (1995)** constatent une augmentation des propriétés antibactériennes des carbonyles aromatiques et aliphatiques sur *Staphylococcus aureus* lorsque la température baisse de 37 °C à 12 °C.

### Application des HE sur les aliments

---

#### L'effet bactéricide

Des chercheurs de l'université de Gand, en Belgique, ont étudié l'effet des HE du basilic et du thym et de leurs principaux composants (thymol, estragol, carvacrol, linalol et *p*-cymène). Ils ont testé leur impact sur le développement de bactéries *Shigella* par une méthode de diffusion sur gel d'agar et directement sur de la laitue.

Selon leurs résultats, l'application d'une solution d'HE du thym, du thymol, ou du carvacrol, concentrée à 0,5 % a entraîné une diminution significative de la population de la bactérie. En portant les concentrations à 1 %, la décontamination a amené la population à un niveau indétectable (**Zarnovican, 2004**).

Il est démontré que l'eugénol et l'extrait du piment inhibent considérablement la croissance d'*Aeromonas hydrophila* dans du bœuf cuit et réfrigéré et dans de la volaille cuite (**Hao et al., 1998a,b**).

Les propriétés organoleptiques d'une viande de bœuf hachée contenant 1% (volume/poids) d'HE d'origan ont été améliorées durant un stockage sous un emballage sous vide et sous une atmosphère modifiée à 5 °C (**Skandamis et Nycha, 2001**).

La conservation de la saveur de filets de bœuf traités avec 0,8 % (volume/poids) d'HE d'origan a été réussie, après un stockage à 5°C et après cuisson (**Tsigarida et al., 2000, Oussalah (2) et al., 2006**).

#### L'effet fongicide

Plusieurs HE de plantes aromatiques dont *Thymus vulgare* et *Ocimum basilicum*, ont totalement inhibé le développement des champignons dans des grains de maïs (**Montes-Belmont et Convajal, 1998**).

L'HE de moutarde quant à elle, a inhibé la croissance des champignons dans du pain (**Nielsen et Rios, 2000**).

Des purées de fruits (bananes et pommes), inoculées par différentes levures, dont *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* et *Zygosaccharomyces bailii*, ont été ensuite soumises à différentes concentrations de vanilline (2 et 3 g.Kg<sup>-1</sup>). La croissance des trois levures notamment était complètement inhibée, durant 40 jours de stockage à 27°C, par 2 g.Kg<sup>-1</sup> de vanilline, aussi bien dans un milieu de culture que dans la purée de pomme (**Cerrutti et Alzamora, 1996**).

# Chapitre V : Matériels et méthodes

## Matériel végétal

Les huiles essentielles étudiées ont été extraites à partir de la partie aérienne de trois espèces du thym à savoir :

- *Thymus munbyanus* Batt., provenant d'Ouzellaguen (Béjaïa) ;
- *Thymus pallescens* de Noé, provenant de Boussaâda (Msila) ;
- *Thymus dreatensis* Batt. , provenant de la région Takoucht (Tizi-Ouzou).
- Et une espèce d'origan :
- *Origanum floribundum* Munby., provenant du mont Chréa (Blida).

## Description des espèces étudiées

---

Les caractéristiques botaniques des 4 plantes ont été citées par **Quezel** et **Santa** en **1963**.

### **T. munbyanus Boiss.**

Espèce présentant des feuilles florales vertes, en général fortement dilatées à leur portion inférieure, et sont différentes des feuilles caulinaires. Les fleurs sont plus grandes à corolle plus longuement exserte. Les épis florifères quant à eux sont larges de 16 à 20 mm (figure 8).

Cette espèce pousse généralement entre 200-1900 m d'altitude et fleurit entre juin et juillet.

### **Thymus pallescens de Noé**

Espèce présentant des tiges dressées et robustes portant des feuilles oblongues lancéolées entières et glabres. Les inflorescences sont plus au moins interrompues vers le bas et les fleurs sont blanches ou pâles à peine plus longues que le calice (figure 9). Commun dans le Tell, le *Thymus pallescens* pousse dans les pelouses et les garrigues. Espèce endémique en Algérie, elle pousse généralement entre 450-750 m.



Figure 8 : *Thymus munbyanus*



Figure 9: *Thymus pallescens*

### **Thymus dreatensis Batt.**

Espèce présentant des tiges prostrées longuement rampantes portant des feuilles ovoïdes toutes identiques. Le calice et les feuilles florales sont hérissés de poils raides. C'est une plante très gazonnante à rameaux florifères courts portant des fleurs roses (figure 10). *Thymus dreatensis* pousse dans les pelouses des hautes montagnes. La période de floraison s'étale du mois de Mai à Juillet. Elle pousse en hautes altitudes (supérieure à 2000 m).

### **Origanum floribundum Munby**

Espèce présentant des tiges prostrées à la base, les jeunes d'entre-elles sont décombantes. Les épis sont lâches à fleurs disjointes après la floraison. La corolle possède des lèvres sensiblement égales (figure 11). Elle pousse dans les pâturages, surtout en montagne.



Figure 10: *Thymus dreatensis*

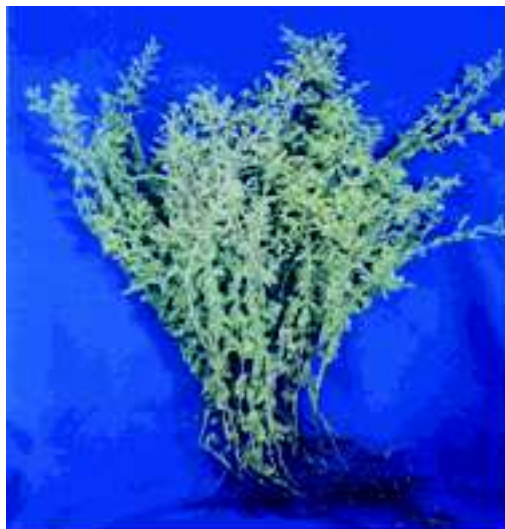


Figure 11: *Origanum floribundum*

## Localisation des sites producteurs d'huiles essentielles

La localisation des sites producteurs d'HE des parties aériennes des plantes étudiées est nécessaire afin d'appréhender les mécanismes mis en jeu lors de son extraction. Pour cela, nous avons pratiqué des coupes anatomiques sur les feuilles et les tiges des 4 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 dans une solution d'hypochlorite de sodium à 12° pour pouvoir vider les cellules de leur contenu pendant 20 mn ;
3. Un rinçage dans de l'eau distillée durant 1 à 5 mn, puis dans de l'acide acétique à 5 % pendant 5 mn ;
4. Une coloration des coupes en utilisant le carmino-vert qui donne une coloration rose pour les parois cellulosesiques et une coloration verte pour les parties lignifiées ;

**Préparation du carmino-vert :**

- Dissoudre l'alun de potasse à chaud ;
- Pour 120 ml d'eau distillée, on utilise :
  - 4g d'alun de potasse ;
  - 2g de carmin.
- Dissoudre du carmin à chaud jusqu'à saturation ;
  - Faire bouillir pendant 30 min ;
  - Agiter pendant 30 min ;
  - Filtrer à froid (environ 12 heures).
- Mélanger les deux solutions pour obtenir du **carmin aluné**.

Pour obtenir le **carmino-vert** ;

- Mélanger 1 volume d'une solution de vert iode à 1% avec 10 volumes de carmin aluné ;
- Ajouter 1 ml d'acide phénique ou d'acide acétique à 10 %. Maintenir à l'abri de la lumière.

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.

## Extraction des huiles essentielles

Durant ce travail, les procédés d'extraction appliqués sont :

### Extraction par solvants volatils

---

L'extraction est réalisée pendant 3 heures au moyen d'un appareil de Soxhlet (**Singh et al**., **2006**). Les solvants organiques utilisés sont : l'éthanol, l'hexane, l'éther diéthylique et le dichlorométhane.

15 grammes de feuilles et des sommités fleuries séchées et broyées du thym de Boussaâda (*Thymus palleescens*) sont utilisées pour chaque extraction. Les extraits obtenus sont ensuite concentrés dans un évaporateur rotatif et conservés au réfrigérateur pour d'éventuelles analyses.

## Extraction par hydrodistillation

---

L'hydrodistillation est considérée comme le seul mode d'extraction retenu par la Pharmacopée Européenne (Mimica-Dukic et al. , 2004, Kabouche et al. , 2005). L'extraction des huiles essentielles est réalisée en utilisant un appareil de type Clevenger modifié.

La matière végétale (100 g), constituée des parties aériennes (feuilles et sommités fleuries) 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.

Le ballon ainsi chauffé, produit de la vapeur chargée de produits volatils. Cette vapeur se condense au contact d'un réfrigérant. Le condensât est recueilli dans une ampoule à décanter lieu où s'effectue la séparation des deux phases non miscibles : phase aqueuse et phase organique, cette dernière constitue l'HE qui sera traitée avec du sulfate de sodium anhydre pour éliminer toutes traces d'eau.

L'HE séchée et séparée du sulfate de sodium par filtration sur de la laine de verre et conservée à une température de réfrigération en vue de son analyse.

## Cinétique de l'extraction

---

Dans notre travail, nous avons étudié la cinétique d'extraction des HE de deux espèces ; *Thymus pallescens* et *Origanum floribundum*, et cela, avec et sans broyage de la matière végétale. Le but cette étude est de déterminer le moyen qui permet d'obtenir les rendements les plus intéressants.

## Rendement de l'extraction

---

Le rendement en HE est définie comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée ( $M_{HE}$ ) et la masse de la matière végétale ( $M_V$ ) séchée à l'air libre, exprimées dans la même unité de masse.

Le rendement en HE, exprimé en pourcentage est donné par la relation suivante :

$$R\% = M_{HE} / M_V$$

## Fractionnement des huiles essentielles

Cette opération de distillation permet de recueillir plusieurs fractions à partir d'une huile essentielle entière extraite d'abord par hydrodistillation. Le fractionnement de l'huile essentielle de *Thymus pallescens*, a été effectué par le biais d'une colonne de type Vigreux.

Les fractions ainsi obtenues sont conservées à une température de réfrigération en vue de leur analyse.

## Caractéristiques des HE

---

La caractérisation d'une essence consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur, saveur) ;
- Déterminer ses indices physiques (densité et indice de réfraction) ;
- Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

## 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).

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

Elle est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'HE à 20 °C, à la masse d'un égal volume d'eau distillée à la même température. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est :



### 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**. Quand la détermination est effectuée à une température ( $T$  °C) différente de 20 °C, on effectue la correction à 20 °C par le biais de la formule:

$$n_D^{20} = n_D^T + 0,0004 (T - 20)$$

$n_D^T$  : est la valeur de la lecture obtenue à la température  $T$ , à laquelle a été effectuée la détermination.

## Analyse qualitative et semi-quantitative des HE par CPG et CG/SM

### Analyse qualitative des HE par CPG

L'analyse qualitative des huiles essentielles par CPG des 4 espèces étudiées en utilisant les deux modes d'extraction et les différentes fractions obtenues, a été effectuée au laboratoire d'analyse instrumentale du département de technologie alimentaire de l'Institut National Agronomique selon les conditions opératoires suivantes :

- Appareil de type CP. Chrompack. 9002) ;
- Colonne capillaire : Stabilwax de phase stationnaire PEG : Polyethyleneglycol (5 %)
  - Longueur : 30 m ;
  - Diamètre interne : 0,32 mm ;
- Programmation de la température : 50 °C en isotherme pendant 3 min puis augmentation de la température à raison de 2 °C/min jusqu'à 220 °C ;
- Gaz vecteur : Azote ;

- Débit du gaz vecteur : 1 ml/min ;
- Volume injecté : 0,2 µL.

L'identification des composés se fait par comparaison de leurs indices de rétentions (indice de Kovats) à ceux cités par la littérature. 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 Kovats (IK) sont calculés selon la formule suivante :

$$IK = 100n + 100^{\frac{TR_c - TR_n}{TR_{n+1} - TR_n}}$$

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

TR<sub>c</sub> : Temps de rétention du composé ;

TR<sub>n</sub> : Temps de rétention de l'alcane à n atomes de carbones élué avant le composé ;

TR<sub>n+1</sub> : Temps de rétention de l'alcane à n + 1 atomes de carbones élué après le composé.

### Analyse semi-quantitative des HE par CG/SM

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

#### Chromatographie phase gazeuse (C.P.G.)

- Appareil du type GC 6890 N (HP Agilent technologies) ;
- Colonne : HP 5-MS (Crosslinked 5% PHME siloxane)
  - Longueur : 30 mètres;
  - Diamètre interne : 0,25 mm ;
  - Epaisseur du film de la phase : 0,25 µm.
- Programmation de la température : 35 °C en isotherme pendant 2 mn puis augmentation de la température à raison de 5° C/mn jusqu'à 320 °C ;
- Mode d'injection : Split à T= 250 °C ;
- Température de détection : 280 °C " interface " ;
- Pression : 6,75 psi ;
- Gaz vecteur : hélium ;
- Débit du gaz vecteur : 1 ml/ mn ;
- Volume injecté : 0,2 µL.

#### Spectrométrie de masse

- Mode de détection : Scan ;
- Appareil : MS-5973 N (HP Agilent Technologies) ;
- 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'éluion 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.

## Evaluation de l'activité antioxydante des HE

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par sept (7) méthodes parmi celles citées par la littérature. En général, le pouvoir antioxydant des huiles essentielles testées a été estimé par comparaison avec des antioxydants de synthèse (BHT, BHA et acide ascorbique) et un antioxydant naturel ( $\alpha$ -tocophérol). Tous les tests ont été réalisés avec 3 répétitions pour chaque concentration.

## Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH<sup>+</sup>

### Principe

La capacité de donation des électrons 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 contenant le radical libre DPPH<sup>+</sup> (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl).

### Mode opératoire

Le test de DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par **Cuendet et al. (1997)**, **Burits et Bucar (2000)**, où 50  $\mu$ l de chacune des dilutions des HE testées, des fractions d'HE et de certains composés purs (BHT, BHA et  $\alpha$ -tocophérol) sont mélangées avec 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004 %). Après une période d'incubation de 30 mn à la température de laboratoire, l'absorbance est lue à 517 nm. Le pourcentage d'activité (I %) est donné par la formule suivante :

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

A blanc : Absorbance du témoin

A éch. : Absorbance de l'échantillon.

## Test de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

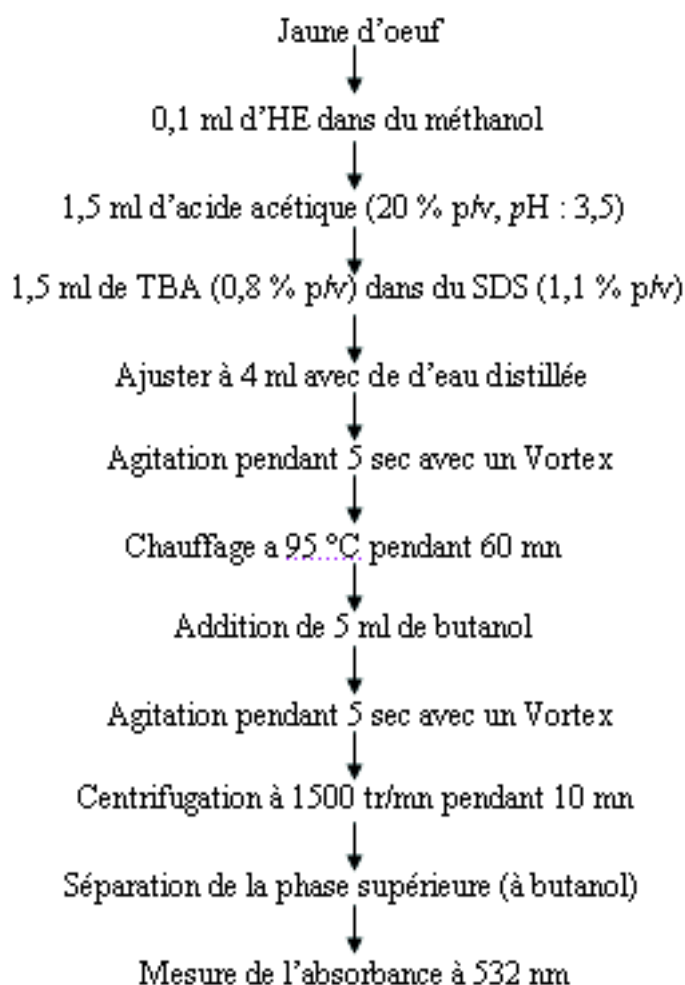
Pour évaluer l'activité antioxydante des huiles essentielles étudiées et de certaines substances testées, deux séries d'expériences ont été menées avec le test de TBARS : une

série contenant un initiateur de peroxydation des lipides 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) et l'autre dépourvue de cet initiateur.

Ce test est réalisé selon la méthode citée par **Dorman et al. (1995)**, **Ruberto et al. (2002)** et **Miguel et al. (2004)** où le jaune d'œuf est utilisé comme substrat riche en lipides.

### Mode opératoire

Les différentes étapes de la mise en œuvre du test de TBARS sont résumées dans le schéma 1 :



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

Le pourcentage d'activité est calculé selon la formule suivante :

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

Avec *C* : Absorbance du témoin complètement oxydé et *T* : Absorbance de l'échantillon.

### 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 (1986)**.

### Mode opératoire

L'estimation du pouvoir réducteur des échantillons étudiés (HE, BHT, BHA et  $\alpha$ -tocophérol) est obtenue selon le protocole expérimental cité dans le schéma 2. Les résultats obtenus sont comparés à ceux trouvés avec de l'acide ascorbique (témoin positif).

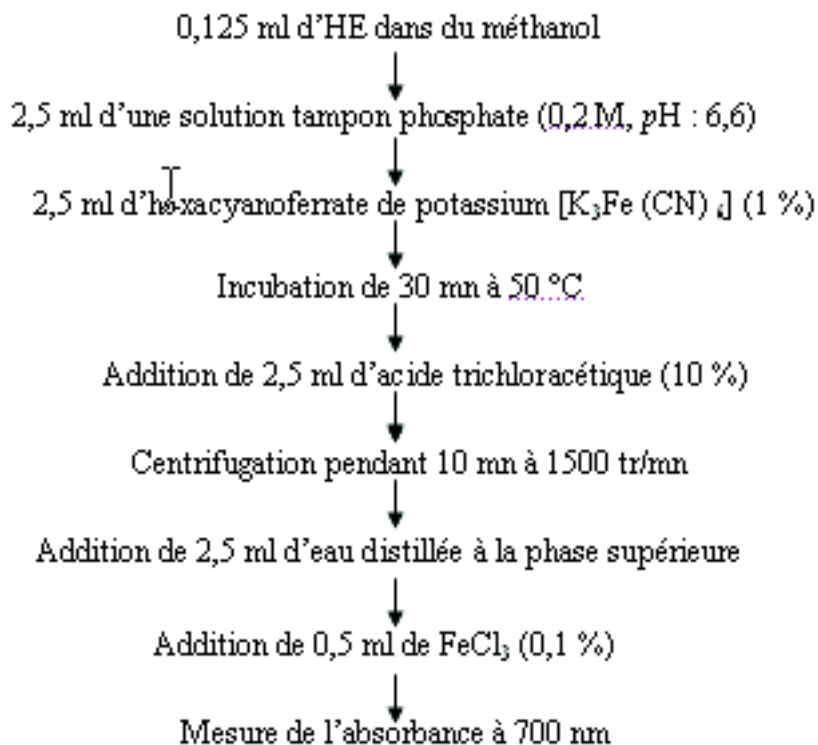


Schéma 2 : Procédé de la mise en œuvre du test du pouvoir réducteur

## Mesure du pouvoir de piégeage du radical hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ )

### Principe

Le pouvoir de piégeage du radical hydroxyle est mis en évidence en évaluant la compétition existante entre le désoxyribose et l'échantillon (HE ou autres substances) vis-à-vis des radicaux hydroxyles générés par le système  $\text{Fe}^{3+}/\text{EDTA}/\text{H}_2\text{O}_2$ .

D'après **Ohkawa et al. (1979)** et **Kunchandy et Rao (1990)**, la dégradation du désoxyribose en présence de ces radicaux, conduit à la formation à chaud et en milieu acide, de substances chromogènes actives en présence de l'acide thiobarbiturique (TBA), c'est-à-dire des TBARS.

### Mode opératoire

Ce test est réalisé selon la méthode décrite par **Halliwel et al. (1987)**. Les différentes concentrations en HE, BHT et tocophérol sont ajoutés au mélange réactionnel contenant 3 mM de désoxyribose, 0,1 mM d'EDTA, 0,1 mM d'acide ascorbique, 0,1 mM de  $\text{FeCl}_3$ , 1

mM de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et 20 mM du tampon phosphate (pH : 7,4) pour atteindre un volume final de 3 ml.

Le mélange réactionnel est incubé pendant 1 heure à 37 °C. Un millilitre de TBA (1 %) et 1 ml d'acide trichloracétique (2,8 %) sont ajoutés aux tubes puis sont incubés à 100 °C pendant 20 mn. Après refroidissement, l'absorbance de la solution résultante ainsi que le blanc (désoxyribose + tampon phosphate), est mesurée à 532 nm. Le pourcentage de dégradation du désoxyribose est calculé selon la formule suivante :

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

Avec : A<sub>0</sub> l'absorbance du témoin et A<sub>1</sub> l'absorbance de l'échantillon.

## Indice de peroxyde (IP) : ISO 3960

---

### Principe

La vitesse d'oxydation d'une huile se traduit par une augmentation de son indice de peroxyde. Durant ce test, l'activité antioxydante des huiles essentielles étudiées comparée à celle des antioxydants de synthèse (BHT et BHA) a été expérimentée sur une huile de tournesol raffinée (Fleurial). Le suivi de l'état oxydatif de l'huile s'est fait en mesurant l'indice de peroxyde.

La détermination de l'indice de peroxyde est la méthode incontournable, mais elle est imparfaite puisqu'elle a un lien avec la peroxydation et non avec le rancissement. Cette méthode normalisée (NF T 60 – 220 annulée et remplacée par ISO 3960), avec une bonne répétabilité, dispose par ailleurs de valeurs de référence (Codex alimentarius et Pharmacopée) (**Judde, 2004**).

Le principe consiste en l'oxydation des iodures en iode par l'oxygène actif du peroxyde. Il est calculé selon la formule suivante :

$$IP = 5 (V_t - V_0)$$

Où: V<sub>t</sub> = Volume de thiosulfate de sodium dans l'essai et V<sub>0</sub> = Volume de thiosulfate utilisé pour le témoin.

### Mode opératoire

L'huile a été répartie dans 37 flacons en verre transparent d'environ 200 ml, remplis à moitié et exposés à la lumière du jour et à la température ambiante. Le tableau 6 indique la répartition des échantillons dans les différents flacons.

**Tableau 6: Répartition des échantillons**



N° du flacon	Contenance
1	Huile témoin
2	Huile + 100 ppm Tp
3	Huile + 200 ppm Tp
4	Huile + 400 ppm Tp
5	Huile + 600 ppm Tp
6	Huile + 800 ppm Tp
7	Huile + 1000 ppm Tp
8	Huile + 100 ppm Td
9	Huile + 200 ppm Td
10	Huile + 400 ppm Td
11	Huile + 600 ppm Td
12	Huile + 800 ppm Td
13	Huile + 1000 ppm Td
14	Huile + 100 ppm Tm
15	Huile + 200 ppm Tm
16	Huile + 400 ppm Tm
17	Huile + 600 ppm Tm
18	Huile + 800 ppm Tm
19	Huile + 1000 ppm Tm
20	Huile + 100 ppm Of
21	Huile + 200 ppm Of
22	Huile + 400 ppm Of
23	Huile + 600 ppm Of
24	Huile + 800 ppm Of
25	Huile + 1000 ppm Of
26	Huile + 100 ppm BHT
27	Huile + 200 ppm BHT
28	Huile + 400 ppm BHT
29	Huile + 600 ppm BHT
30	Huile + 800 ppm BHT
31	Huile + 1000 ppm BHT
32	Huile + 100 ppm BHA
33	Huile + 200 ppm BHA
34	Huile + 400 ppm BHA
35	Huile + 600 ppm BHA
36	Huile + 800 ppm BHA
37	Huile + 1000 ppm BHA

Tp : *Thymus pallescens*, Td : *Thymus dreatensis*, Tm : *Thymus munbyanus*, Of : *Origanum floribundum*, ppm : partie par million.

La mesure de l'IP s'effectue à des intervalles de temps plus ou moins réguliers pendant une durée de stockage **88 jours**.

## Mesures des diènes conjugués : Norme ISO 3656

### Principe

La mesure des diènes conjugués est une méthode rapide réalisée par mesure spectrophotométrique à 232 nm directement sur le corps gras. Cette méthode vient parfois remplacée l'indice de peroxyde, C'est une méthode normalisée (NF T 60 – 223 annulée et remplacée par ISO 3656), corrélée à la présence de formes diènes conjuguées.

Elle est couramment réalisée dans de l'hexane, le cyclohexane ou dans des alcools tels que l'éthanol, le méthanol ou l'isopropanol.

### Mode opératoire

Après dissolution de 100 mg d'huile de tournesol dans 10 ml de solvant (cyclohexane), diluer 10 fois cette solution obtenue et mesurer l'absorbance à 232 nm (**Wolff, 1968**).

## Dosage des acides gras par chromatographie phase gazeuse

---

### Principe

La composition en acides gras des différents échantillons de l'huile de tournesol (Tableau 6) a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) des esters méthyliques d'acides gras.

L'injection en CPG d'un corps gras est précédée d'une méthylation directe des AG, présents sous forme libre ou estérifiés dans le mélange, afin de les rendre plus volatils.

### Mode opératoire

La méthylation des acides gras est réalisée selon la méthode décrite par **Lessoued (1998)**, une méthode qui à l'avantage d'être simple, rapide et ne demande qu'une quantité très faible de matière grasse (100 mg) (**Babouri, 2003**). Elle fait appel à un traitement par l'hydroxyde de sodium méthanolique 2N et de l'acide chlorhydrique 1N. Les esters méthyliques ainsi formés sont récupérés après centrifugation avant d'être analysé par CPG selon les conditions opératoires suivantes :

- Appareil de type CP. Chrompack. 9002 ;
- Colonne capillaire : CP silicone 88 ;
  - Longueur : 25 m ;
  - Diamètre interne : 0,32 mm ;
- Température de l'injecteur : 250 °C ;
- Température maximale du four : 180 °C ;
- Température du détecteur : 250 °C ;
- Gaz vecteur : Azote ;
- Débit du gaz vecteur : 1 ml/min ;
- Volume injecté : 0,2 uL.

## Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des HE étudiées, a été appréciée selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose appelés

aromatogrammes. Les tests ont été effectués au niveau du **CRD-SAIDAL** (El-Harrach, Alger). Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des ATB « Pharmacopée Européenne, 2002 ». Le mode opératoire quant à lui, a été approuvé par la directrice du laboratoire de microbiologie du **CRD-SAIDAL**.

La méthode de diffusion sur milieu gélosé a été utilisée au par avant par plusieurs chercheurs, et récemment par : **Chao et al . (2000)** et **Ozcan et al ., (2003)**.

## Principe

La méthode des aromatoigrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose (Diamètre : 6 mm) imprégné de l'HE à tester, 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 (mm ou cm) de la zone claire autour du disque (halo translucide), appelée : zone d'inhibition (Figure 12).

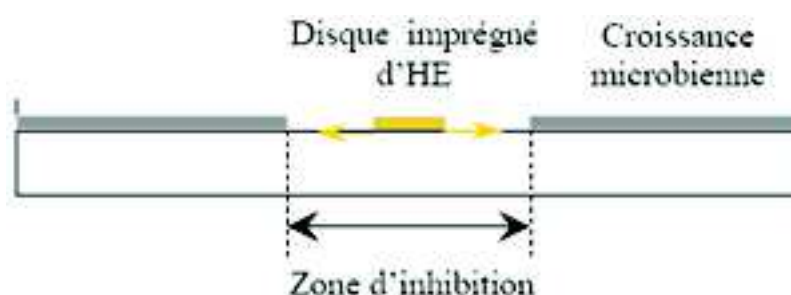


Figure 12: Schéma simplifié du principe de la méthode des aromatoigrammes

## Micro-organismes testés

L'activité antimicrobienne des HE étudiées a été testée sur 07 micro-organismes pathogènes (Tableau 7), des souches pures et issues de la collection du laboratoire de microbiologie du **CRD-SAIDAL**.

Tableau 7: Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées

Nom de la souche	N° ATCC	Gram	Famille
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	Streptococcaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Micrococcaceae
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	+	Micrococcaceae
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	Pseudomonadaceae
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	Enterobacteriaceae
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	Enterobacteriaceae
<i>Candida albicans</i>	24433		Cryptococcaceae

## Protocole expérimental

### Préparation de l'inoculum

- Pour les bactéries

Les suspensions bactériennes ont été réalisées par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18 h, les mettre ensuite dans 5 ml d'eau physiologique stérile, puis agiter au vortex pendant quelques secondes.

La lecture de la transmittance est effectuée en utilisant un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. La valeur de la transmittance doit être comprise 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 utilisée pour les bactéries sauf que, pour les levures, la culture doit être âgée de 48 h et que la valeur de la transmittance doit être entre 2 % et 3 %, ce qui correspond toujours à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml.

NB : L'inoculum doit être utilisé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

### Examen de l'échantillon

- Préparation des milieux de culture (Selon Guiraud, 2003)
- 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 laisse fondre (voir 7), tous avec 3 répétitions pour chaque concentration. refroidir jusqu'à atteindre une température de 45 °C, des flacons en verre stérile 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. Étaler 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'HE à tester, sont déposés sur la surface de la gélose, puis laisser 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 H pour les levures.

## Analyse statistique

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des HE testées ont fait l'objet d'une analyse de la variance et d'une analyse par le test de *Tuckey* en utilisant le logiciel SPSS 8.0.

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

### Localisation des sites producteurs d'huiles essentielles

#### Les Thymus

---

L'observation des coupes histologiques de la tige et de la feuille de deux espèces du thym (*Thymus dreatensis* et *Thymus munbyanus*) révèle, bel et bien, la présence de poils tecteurs (PT) et sécréteurs (PS) autour des organes (tiges et feuilles) comme l'illustrent les figures 13 et 14.

Pour le thym de Boussaâda (*Thymus pallescens*), les coupes histologiques n'ont pas été réalisées par défaut de matière végétale fraîche.

Les différences que nous avons pu relever par rapport aux poils de la tige résident dans le fait que ces poils sont plus abondants sur la tige qu'au niveau de la feuille et ils devraient en principe fournir la majeure partie des huiles essentielles.

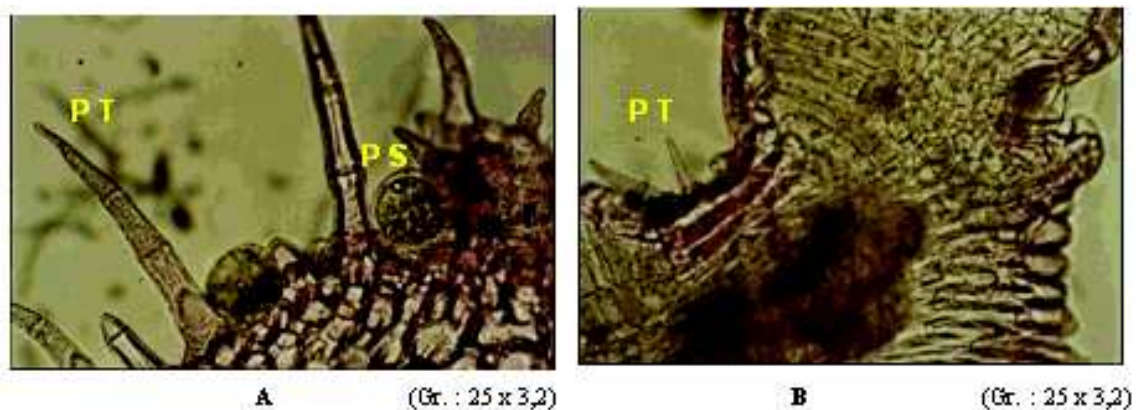


Figure 13 : Coupe transversale de la feuille (A) et de la tige (B) de *Thymus dreatensis*

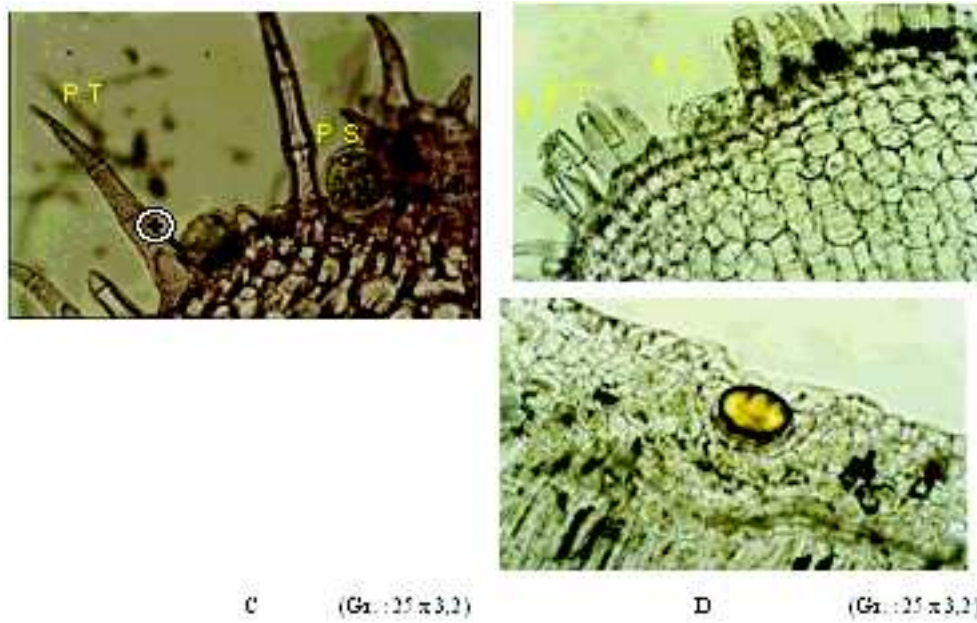


Figure 14: Coupe transversale de la tige (C) et de la feuille (D) de *Thymus munbyanus*  
(PT : poil tecteur, PS : poil sécréteur)

## L'origan

Les coupes histologiques réalisées sur les organes aériens (tige et feuille) d'*Origanum floribundum* de Chréa révèlent la présence de poils tecteurs, sécréteurs et glandulaire (figures 15).

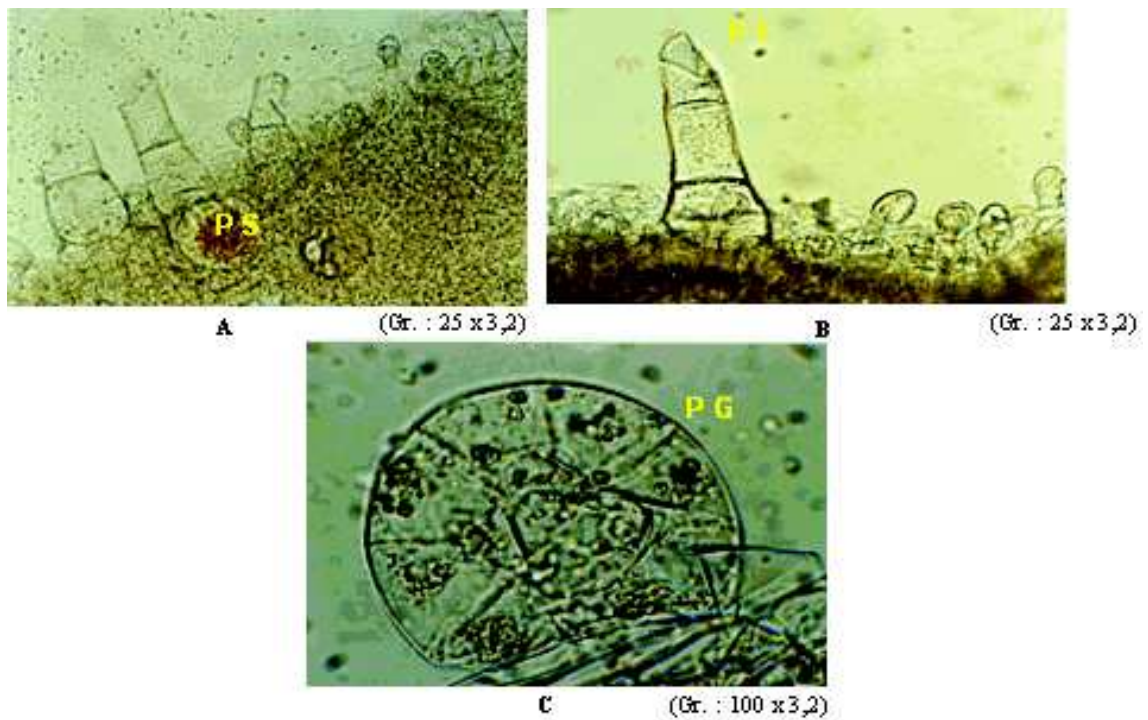


Figure 15: Coupe transversale de la tige (A) et de la feuille (B et C) de l'origan (*Origanum floribundum*)

(PT : poil tecteur, PS : poil sécréteur, PG : poil glandulaire)

## Rendement de l'extraction en HE

### Les Thymus

---

Les rendements d'extraction en huiles essentielles des trois espèces du thym exprimés en grammes par 100 g de la matière végétale sèche, pendant la période de floraison, sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8: Rendement en huile essentielle des trois espèces du thym

Espèces	Rendement (g /100 g)
<i>Thymus munbyanus</i>	2,8
<i>Thymus pallescens</i>	4,6
<i>Thymus dreatensis</i>	3,1

Les rendements en HE illustrés dans le tableau 8, montrent que le meilleur rendement est enregistré sur *Thymus pallescens*. Ce rendement est largement supérieur à celui trouvé par **Bousbia (2004)** mais équivalent à celui signalé par **Chikhouné (2004)** en travaillant sur la même espèce qui provenait de la région de Tablât. Les rendements obtenus par ces auteurs sont respectivement 2,9 et 4,7 %.

Cet écart est probablement attribué à la différence de provenance du matériel végétal ainsi qu'à la période de récolte.

### L'origan

---

Le rendement de l'extraction de l'huile essentielle de l'origan de Chréa (*Origanum floribundum*), exprimé en grammes par 100 g de la matière végétale sèche, pendant la période de floraison, est donné dans le tableau 9.

Tableau 9: Rendement d'extraction de l'origan de Chréa en période de floraison

Espèce	Rendement (g /100 g)
<i>Origanum floribundum</i>	4,3

D'après ce tableau, le rendement obtenu pour cette espèce est largement supérieur à celui rapporté par **Azzoudj (1999)** en travaillant sur la même espèce et de même provenance (3,0 %). Cet écart peut être interprété par la fluctuation des conditions climatiques ou tout simplement du à la période de récolte.

## La cinétique d'extraction des HE

---



Dans le but d'étudier l'influence de l'état de la matière végétale (entière, broyée) sur la cinétique d'extraction, l'évolution du rendement en huile essentielle en fonction de la durée d'extraction a été réalisé. Une masse d'environ 100 g a été soumise à une hydrodistillation pendant une durée de 120 mn. Les fractions de l'huile essentielle ont été récupérées à des intervalles de temps réguliers.

### Cas du thym (*Thymus palleescens*)

Les résultats de la cinétique d'extraction de l'HE du thym de Boussaâda sont regroupés dans le tableau 10 et figures 16 :

Temps (min)	Avec broyage			Sans broyage		
	V (ml)	Rdt <sub>i</sub> (%)	Rdt <sub>t</sub> (%)	V (ml)	Rdt <sub>i</sub> (%)	Rdt <sub>t</sub> (%)
5	1,05	0,99	0,99	0,90	0,85	0,85
10	2,00	0,90	1,89	1,75	0,80	1,65
15	2,75	0,75	2,60	2,60	0,80	2,46
20	3,30	0,52	3,12	3,40	0,75	3,22
25	3,60	0,28	3,40	3,85	0,42	3,64
30	3,85	0,23	3,64	4,15	0,28	3,93
35	4,00	0,14	3,78	4,35	0,18	4,11
40	4,10	0,09	3,88	4,50	0,14	4,26
45	4,15	0,04	3,93	4,60	0,09	4,35
50	4,20	0,04	3,97	4,70	0,09	4,45
55	4,25	0,04	4,02	4,80	0,09	4,54
60	4,25	0,00	4,02	4,85	0,04	4,59
65	4,25	0,00	4,02	4,90	0,04	4,64
70	4,25	0,00	4,02	4,95	0,04	4,68
75	4,25	0,00	4,02	4,95	0,00	4,68
80	4,25	0,00	4,02	4,95	0,00	4,68
85	4,25	0,00	4,02	4,95	0,00	4,68
90	4,25	0,00	4,02	4,95	0,00	4,68
95	4,25	0,00	4,02	4,95	0,00	4,68
100	4,25	0,00	4,02	4,95	0,00	4,68
105	4,25	0,00	4,02	4,95	0,00	4,68
110	4,25	0,00	4,02	4,95	0,00	4,68
115	4,25	0,00	4,02	4,95	0,00	4,68
120	4,25	0,00	4,02	4,95	0,00	4,68

Tableau 10: Variation du rendement en HE de *Thymus palleescens* en fonction du temps d'extraction

V (ml) : Volume cumulé en HE.

Rdt<sub>i</sub> (%) : Rendement instantané en HE (de la prise au temps t).

**Rdt<sub>c</sub> (%)** : Rendement cumulé en HE.

Au début de l'extraction, le volume (V) et le rendement (Rdt) cumulés en HE sont plus importants dans le cas d'une extraction avec broyage. Les rendements enregistrés sont **2,60 %** et de **2,46 %** respectivement pour une extraction avec et sans broyage après 15 mn. A partir de la 20<sup>ème</sup> mn, le volume et le Rdt cumulés sont plus importants lorsque la matière végétale n'est pas broyée.

Durant les 15 premières minutes de l'extraction, le Rdt cumulé était plus important avec broyage, ceci est probablement dû à l'augmentation de la surface de contact. Après cela, les résultats obtenus sont plus intéressants dans le cas de l'extraction sans broyage.

Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les HE sont des substances très volatiles et que durant le broyage, une partie de ces huiles c'est volatilisé.

Le Rendement maximal en HE est obtenu après 55 mn pour l'extraction avec broyage et après 70 mn pour le cas sans broyage.

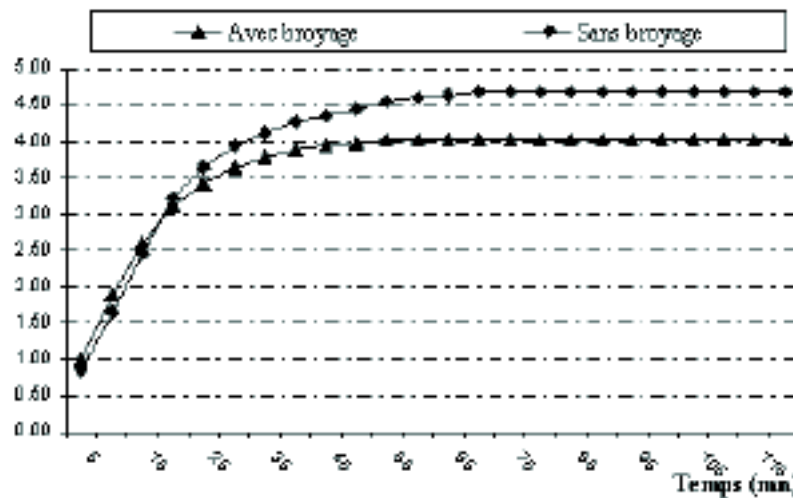


Figure 1: Cinétique d'extraction de l'HE du thym au cours du temps

Les vitesses instantanées d'extraction de l'HE du thym sont calculées à partir des rendements instantanés en HE notés chaque 5 mn. Les résultats obtenus sont représentés graphiquement dans la figure 17.

Une diminution accrue de la vitesse instantanée d'extraction des HE est observée dans les deux cas. Néanmoins, cette diminution est plus importante dans le cas de l'extraction avec broyage.

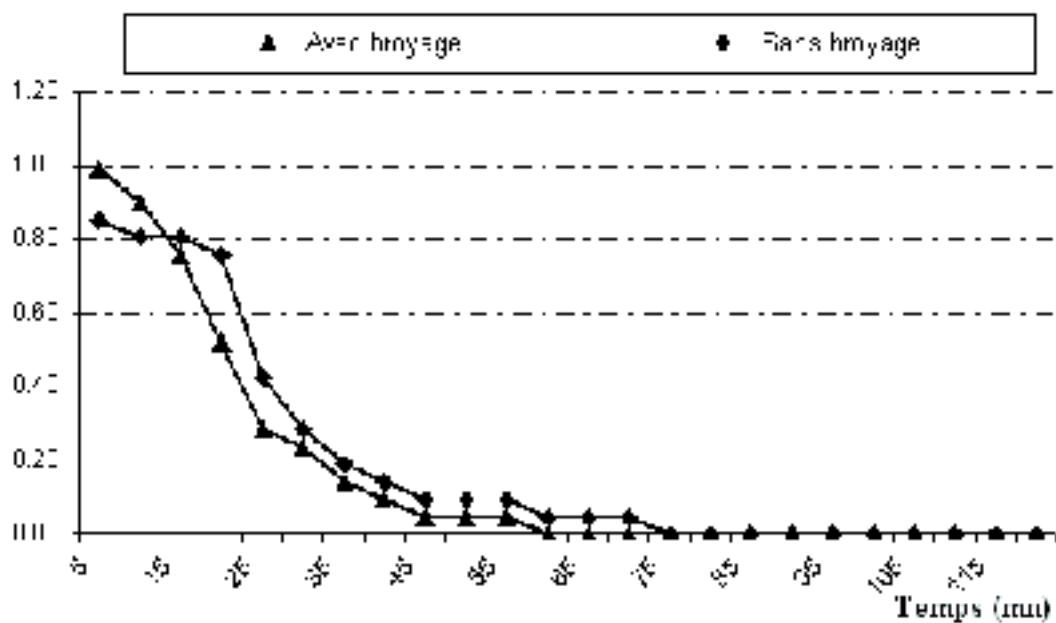


Figure 17: Evolution de la vitesse instantanée en fonction de la durée d'extraction de l'HE du *Thymus pallescens*

### Cas de l'origan

Les résultats de la cinétique d'extraction de l'HE d'*Origanum floribundum* sont regroupés dans le tableau 11 et les figures 18:

Temps (min)	Avec broyage			Sans broyage		
	Y (ml)	Rdt, (%)	Rdt <sub>c</sub> (%)	Y (ml)	Rdt, (%)	Rdt <sub>c</sub> (%)
5	1,40	1,31	1,31	1,30	1,21	1,21
10	2,40	0,93	2,24	2,25	0,88	2,10
15	2,90	0,46	2,71	2,75	0,46	2,57
20	3,05	0,23	2,85	3,20	0,32	2,99
25	3,30	0,14	3,09	3,65	0,19	3,32
30	3,45	0,14	3,22	3,75	0,18	3,51
35	3,65	0,09	3,32	3,95	0,19	3,89
40	3,65	0,09	3,41	4,10	0,14	3,83
45	3,70	0,04	3,46	4,25	0,14	3,97
50	3,75	0,04	3,51	4,35	0,09	4,07
55	3,90	0,04	3,55	4,45	0,09	4,16
60	3,80	0,00	3,55	4,55	0,04	4,21
65	3,90	0,00	3,55	4,65	0,04	4,25
70	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
75	3,90	0,00	3,55	4,65	0,00	4,26
80	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
85	3,90	0,00	3,55	4,65	0,00	4,26
90	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
95	3,90	0,00	3,55	4,65	0,00	4,26
100	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
105	3,90	0,00	3,55	4,65	0,00	4,26
110	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
115	3,90	0,00	3,55	4,65	0,00	4,26
120	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25

Tableau 11: Variation du rendement en HE de l'origan en fonction du temps d'extraction

Les résultats de la cinétique d'extraction de l'HE de l'origan sont similaires à ceux obtenus précédemment avec du thym.

Au début de l'extraction, pendant les 15 premières minutes, le volume et le Rdt cumulés en HE sont plus importants lors de l'extraction avec broyage. On a enregistré un Rdt de **2,71 %** et de **2,57 %** respectivement pour une extraction avec et sans broyage après 15 mn. Dès la 20<sup>ème</sup> mn, le meilleur Rendement cumulés est signalé dans le cas de la matière végétale non broyée. Les mêmes arguments cités dans le cas du thym, peuvent interpréter ces résultats.

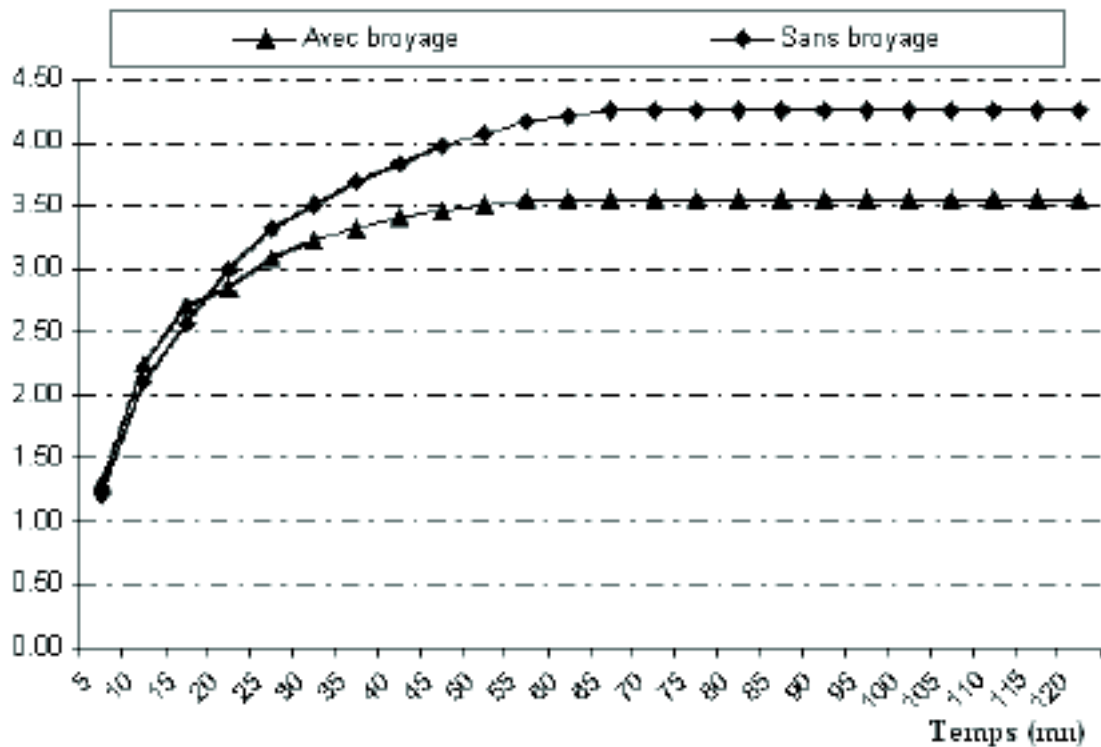


Figure 18: Evolution du rendement d'extraction en HE de l'origan au cours du temps

La majeure partie des HE de l'origan est extraite après 45 mn, ce qui correspond à **97,35 %** et à **93,40 %** de la totalité des HE extraites, respectivement avec et sans broyage.

Un palier est enregistré après 55 mn dans le cas avec broyage et 65 mn dans le cas sans broyage, ce qui signifie qu'il n'y a plus d'HE à extraire. A cet instant, l'extraction peut-être interrompue.

Une nette diminution de la vitesse instantanée d'extraction des HE est remarquée dans les deux cas. Néanmoins, cette diminution est plus importante dans le cas d'un broyage (Figure 19).

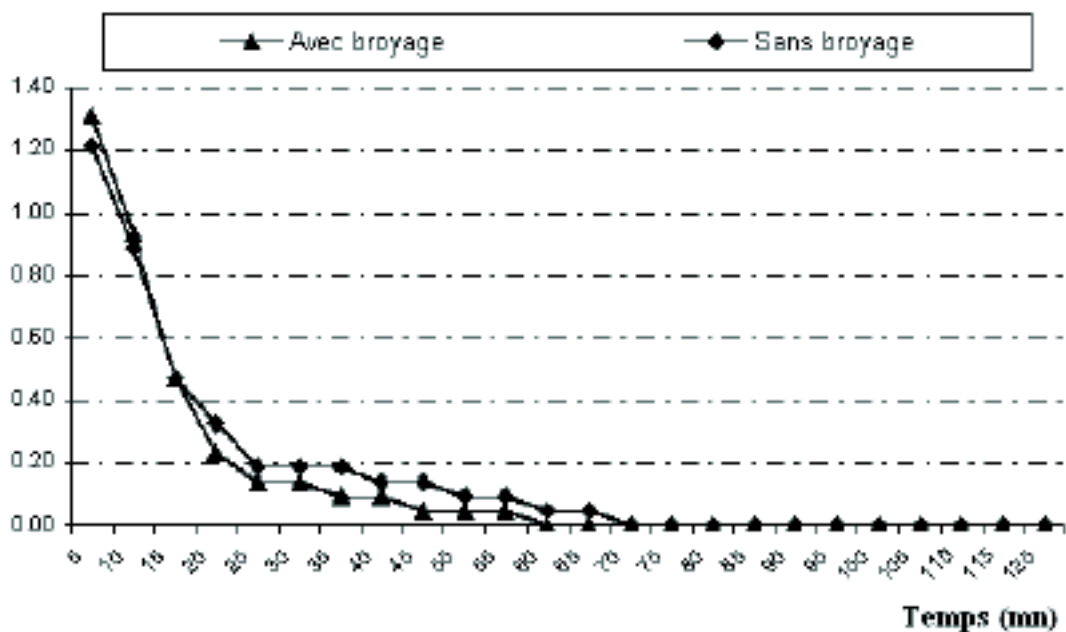


Figure 19: Evolution de la vitesse instantanée en fonction de la durée d'extraction de l'HE d'origan

## Conclusion

D'une manière générale, les rendements en HE obtenus sont plus importants dans le cas d'une extraction sans broyage de la matière végétale des deux espèces étudiées. Par conséquent, il est plus intéressant d'effectuer une extraction sans broyage de la matière végétale.

## Caractéristiques des HE

### Caractéristiques physiques et organoleptiques

#### Cas des Thymus

Les caractéristiques physiques et organoleptiques des huiles essentielles des trois espèces du thym étudiées sont résumées dans le tableau 12.

Caractéristiques		Huiles essentielles		
		<i>Thymus mastichinus</i>	<i>Thymus pallasianus</i>	<i>Thymus abrotanoides</i>
Organoleptiques	Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile	Liquide mobile
	Couleur	Jaune claire	Couleur orangée	Jaune orangé
	Odeur	Caractéristique, aromatique, phénolique avec un fond légèrement épicé		
Physiques	Indice de réfraction à 20°C	1,495	1,493	1,485
	Densité relative à 20°C	0,914	0,930	0,937

Tableau 12: Caractéristiques physiques et organoleptiques des trois espèces du thym

Ces résultats sont conformes à ceux cités dans la littérature et ceux données par AFNOR (2000) (Tableau 13).

Huile essentielle	Aspect, couleur	Odeur	Densité relative à 20°C	Indice de réfraction à 20°C
<i>Thymus spgts</i> Loebl.	Liquide, brun rouge		0,915	1,498
Espagne <sup>(1)</sup>			à	à
<i>Thymus mastichinus</i> L. <sup>(1)</sup>	Liquide	Caractéristique, aromatique,	0,935	1,505
	Jaune pale	phénolique, agréable à	0,900	1,463
<i>Thymus vulgaris</i> L. <sup>(1)</sup>	Liquide	avec un fond légèrement épicé.	0,930	1,468
	Brun à brun rouge		0,911	1,494
			à	à
			0,931	1,500

Tableau 13 : Caractéristiques physiques et organoleptiques de quelques espèces du thym selon AFNOR (2000) et Masada (1976).

Normes Afnor, 2000.

Masada, 1976.

### Cas de l'origan

Les résultats de l'analyse physique et organoleptiques d'*Origanum floribundum* sont rapportés dans le tableau 14.

Caractéristiques	Huile essentielle	
	<i>Origanum floribundum</i>	
Organoleptique	Aspect	Liquide mobile
	Couleur	Jaune
	Odeur	Caractéristique, agréable, aromatique, phénolique avec un fond légèrement épicé
Physiques	Indice de réfraction à 20°C	1,300
	Densité relative à 20°C	0,936

Tableau 14: Caractéristiques physiques et organoleptiques de l'origan de Chréa

Ces résultats sont légèrement différents de ceux cités par **Belaiche (1979)** en travaillant sur une espèce d'origan poussant en Espagne (Tableau 15).

Tableau 15: Caractéristiques physiques et organoleptiques de l'origan d'Espagne Belaiche (1979)

Huile essentielle	Couleur	Densité relative à 20°C	Indice de réfraction à 20°C
Origan d'Espagne	Brun foncé	0,945	1,508

## Analyse qualitative et semi-quantitative des HE par CPG et CG/SM

### Analyse qualitative des HE par CPG

#### Thymus pallescens

##### A) Extraction par solvants

##### a) Extraction par l'hexane

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'extrait par l'hexane de *Thymus pallescens* a fourni 55 pics dont 42 ont été identifiés (Tableau 16).



N°	IR	Composé	Identification	IR littéraires
1	1033	$\alpha$ -Pinène	s	1032
2	1036	$\alpha$ -Thuyène	c	1035
3	1080	Camphène	c	1072
4	1122	$\beta$ -Pinène	c	1119
5	1163	$\beta$ -3-Caène	c	1163
6	1175	$\beta$ -Myrcène	c	1173
7	1180	$\alpha$ -Phellandène	c	1177
8	1196	$\alpha$ -Terpinène	c	1192
9	1216	Limonène	c	1212
10	1227	$\beta$ -Phellandène	c	1222
11	1265	$\gamma$ -Terpinène	c	1261
12	1275	Trans- $\beta$ -Ocimène	c	1272
13	1294	p-Cymène	c	1290
14	1304	Terpinolène	c	1300
15	1391	Nonanal	c	1417
16	1463	1-Octen, 3-Ol	c	1462
17	1483	trans-Sabinène Hydrate	c	1482
18	1509	$\alpha$ -Copaène	c	1509
19	1548	$\beta$ -Bourbonène	c	1536
20	1558	Linakol	c	1558
21	1567	cis-Sabinène hydrate	c	1567
22	1621	Terpinen-4-ol	c	1613
23	1626	$\beta$ -Caryophyllène	c	1620
24	1675	$\alpha$ -Humulène	c	1687
25	1717	$\omega$ -Terpinol	c	1723
26	1725	Borneol	c	1732
27	1734	Oenanthène D	c	1742
28	1748	$\beta$ -Basilolène	c	1748
29	1759	$\beta$ -Cadinène	c	1772
30	1786	$\gamma$ -Cadinène	c	1776
31	1795	trans-Cadène-1-4-dimè	c	1799
32	1881	Carviol	c	1882
33	1901	Myrsanol	c	1889
34	2051	Caryophyllène oxide	c	2051
35	2120	Gibbucol	c	2105
36	2148	Spathulol	c	2145
37	2175	Euganol	c	2192
38	2194	T-Cadinol	c	2198
39	2198	T-Cadinol	c	2198
40	2311	Thymol	c, s	2312
41	2325	$\alpha$ -Cadinol	c, s	2339
42	2335	Carviol	c, s	2338

Tableau 16: Analyse qualitatif par CPG de l'extrait par l'hexane de *Thymus pallescens*

**IR** : Indices de rétentions relatifs aux n-alcane C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne polaire Stabilwax (PEG).

**c** : Comparaison avec les IR cités par la littérature. **s** : comparaison avec des standards (étalons).

### b) Extraction par l'éther diéthylique

L'analyse par CPG de l'extrait par l'éther diéthylique de *Thymus pallescens* sur colonne capillaire polaire Stabilwax (PEG) a fournis 24 pics dont 21 ont été identifiés (Tableau 17).

Temps (min)	Avec broyage			Sans broyage		
	V (ml)	Rdt <sub>t</sub> (%)	Rdt <sub>s</sub> (%)	V (ml)	Rdt <sub>t</sub> (%)	Rdt <sub>s</sub> (%)
5	1,40	1,31	1,31	1,30	1,21	1,21
10	2,40	0,93	2,24	2,25	0,88	2,10
15	2,90	0,46	2,71	2,75	0,46	2,57
20	3,05	0,23	2,85	3,20	0,32	2,99
25	3,30	0,14	3,08	3,55	0,18	3,32
30	3,45	0,14	3,22	3,75	0,18	3,51
35	3,55	0,09	3,32	3,95	0,18	3,69
40	3,65	0,09	3,41	4,10	0,14	3,83
45	3,70	0,04	3,46	4,25	0,14	3,97
50	3,75	0,04	3,51	4,35	0,09	4,07
55	3,80	0,04	3,55	4,45	0,09	4,16
60	3,80	0,00	3,55	4,55	0,04	4,21
65	3,80	0,00	3,55	4,55	0,04	4,25
70	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
75	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
80	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
85	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
90	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
95	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
100	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
105	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
110	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
115	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25
120	3,80	0,00	3,55	4,55	0,00	4,25

Tableau 17: Analyse qualitatif par CPG de l'extrait par l'éther diéthylique du thym de Boussaâda (*Thymus pallescens*)

IR : Indices de rétentions relatifs aux n-alcanes C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne polaire Stabilwax (PEG).

c : Comparaison avec les IR cités par la littérature. s : comparaison avec des standards (étalons).

### c) Extraction par l'éthanol

L'analyse chromatographique de l'extrait par l'éthanol du thym de Boussaâda a permis d'identifier 31 composés sur 45 pics obtenus (Tableau 18).

N°	IR	Composés	Identification	IR littératures
1	1173	$\beta$ -Myrcene	c	1173
2	1194	$\alpha$ -Terpinene	c	1192
3	1214	Limonene	c	1212
4	1251	cis- $\beta$ -Ocimene	c	1246
5	1262	$\gamma$ -Terpinene	c	1261
6	1274	trans- $\beta$ -Ocimene	c	1272
7	1291	$\rho$ -Cymène	c	1290
8	1312	Terpinolene	c	1300
9	1404	Nonanal	c	1417
10	1461	1-Octen, 3-Ol	c	1462
11	1481	trans-Sabinene Hydrate	c	1482
12	1546	$\beta$ -Bourbonene	c	1536
13	1556	Linalool	c	1558
14	1565	cis-Sabinene hydrate	c	1567
15	1618	Terpinen-4-ol	c	1613
16	1623	$\beta$ -Caryophyllene	c	1620
17	1685	$\alpha$ -Humulene	c	1687
18	1713	$\gamma$ -Muurolene	c	1704
19	1722	$\alpha$ -Terpineol	c	1723
20	1730	Borneol	c	1732
21	1745	$\beta$ -Bisabolene	c	1748
22	1782	$\delta$ -Cadinene	c	1772
23	1788	$\gamma$ -Cadinene	c	1776
24	1792	trans-Cadina-1-4-diene	c	1799
25	1878	Carveol	c	1881
26	2151	Spathulenol	c	2145
27	2171	Eugenol	c	2192
28	2194	T-Cadinol	c	2198
29	2308	Thymol	c, s	2312
30	2322	$\alpha$ -Cadinol	c, s	2359
31	2332	Carvacrol	c, s	2338

Tableau 18: Analyse qualitatif par CPG de l'extrait par l'éthanol de *Thymus palleescens*

**IR** : Indices de rétentions relatifs aux n-alcane C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne polaire Stabilwax (PEG).

**c** : Comparaison avec les IR cités par la littérature. **s** : comparaison avec des standards (étalons).

#### d) Extraction par le dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

L'analyse chromatographique de l'extrait par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> du thym de Boussaâda a permis d'identifier 35 composés sur 46 pics obtenus (Tableau 19).

N°	IR	Composés	Identification	IR littératures
1	1030	$\alpha$ -Pinene	s	1032
2	1034	$\alpha$ -Thujene	c	1035
3	1077	Camphene	c	1072
4	1120	$\beta$ -Pinene	c	1119
5	1160	$\delta$ -3-Carene	c	1163
6	1172	$\beta$ -Myrcene	c	1173
7	1178	$\alpha$ -Phellandrene	c	1177
8	1193	$\alpha$ -Terpinene	c	1192
9	1213	Limonene	c	1212
10	1224	$\beta$ -Phellandrene	c	1222
11	1262	$\gamma$ -Terpinene	c	1261
12	1273	<i>trans</i> - $\beta$ -Orimene	c	1272
13	1291	$\rho$ -Cymène	c	1290
14	1302	Terpinolene	c	1300
15	1404	Nonanal	c	1417
16	1461	1-Octen, 3-Ol	c	1462
17	1481	<i>trans</i> -Sabinene Hydrate	c	1482
18	1547	$\beta$ -Bourbonene	c	1536
19	1556	Linalool	c	1558
20	1566	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	c	1567
21	1619	Terpinen-4-ol	c	1613
22	1624	$\beta$ -Caryophyllene	c	1620
15	1404	Nonanal	c	1417
16	1461	1-Octen, 3-Ol	c	1462
17	1481	<i>trans</i> -Sabinene Hydrate	c	1482
18	1547	$\beta$ -Bourbonene	c	1536
19	1556	Linalool	c	1558
20	1566	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	c	1567
21	1619	Terpinen-4-ol	c	1613
22	1624	$\beta$ -Caryophyllene	c	1620
23	1673	$\alpha$ -Humulene	c	1687
24	1724	$\alpha$ -Terpineol	c	1723
25	1732	Borneol	c	1732
26	1747	$\beta$ -Bisabolene	c	1748
27	1768	$\delta$ -Cadinene	c	1772
28	1785	$\gamma$ -Cadinene	c	1776
29	1794	<i>trans</i> -Cadina-1-4-diene	c	1799
30	2120	Globulol	c	2105
31	2178	Eugenol	c	2192
32	2198	1-Cadinol	c	2198
33	2297	Thymol	c, s	2312
34	2311	$\alpha$ -Cadinol	c, s	2359
35	2325	Carvacrol	c, s	2338

Tableau 19: Analyse qualitatif par CPG de l'extrait par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *Thymus palleescens*

IR : Indices de rétentions relatifs aux n-alcanes C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne polaire Stabilwax (PEG).

c : Comparaison avec les IR cités par la littérature. s : comparaison avec des standards (étalons).

### B) Extraction par hydrodistillation

L'analyse de l'huile essentielle du thym de Boussaâda par CPG sur une colonne polaire Stabilwax (PEG) a fournis 79 pics dont 46 ont été identifiés (Tableau 20).

N°	IR	Composés	Identification	IR littératures
1	1074	Camphène	c	1072
2	1136	Sabinène	c	1132
3	1151	Carène	s	1140
4	1164	$\delta$ -3-Carène	c	1163
5	1169	$\beta$ -Myrcène	c	1173
6	1184	$\alpha$ -Terpinène	c	1192
7	1204	Limonène	c	1212
8	1217	$\beta$ -Phellandrène	c	1222
9	1237	cis- $\beta$ -Ocimène	c	1246
10	1254	$\gamma$ -Terpinène	c	1261
11	1273	trans- $\beta$ -Ocimène	c	1272
12	1282	p-Cymène	c	1290
13	1292	Terpinolène	c	1300
14	1406	Nonanal	c	1417
15	1466	1-Octen, 3-Ol	c	1462
16	1507	$\alpha$ -Copaène	c	1509
17	1536	$\beta$ -Bourbonène	c	1536
18	1546	Linalool	c	1558
19	1568	cis-Sabinène hydrate	c	1567
20	1606	Thymol methyl ether	c	1611
21	1610	Terpinen-4-ol	c	1613
22	1623	$\beta$ -Caryophyllène	c	1620
23	1680	$\alpha$ -Humulène	c	1687
24	1700	$\gamma$ -Muurolène	c	1704
25	1719	$\alpha$ -Terpineol	c	1723
27	1727	Borneol	c	1732
28	1742	Germacrène D	c	1742
29	1746	$\beta$ -Bisabolène	c	1748
30	1774	$\delta$ -Cadinène	c	1772
31	1778	$\gamma$ -Cadinène	c	1776
32	1797	trans-Cadina-1-4-diene	c	1799
33	1982	Carvacrol methyl ether	c	1976
34	2107	Globulol	c	2105
35	2141	Spathulenol	c	2145
36	2191	Eugenol	c	2192
37	2198	T-Cadinol	c	2198
38	2314	Thymol	c, s	2312
39	2317	$\alpha$ -Cadinol	c, s	2359
40	2327	Carvacrol	c, s	2338

Tableau 20: Analyse qualitative de HE de *Thymus pallescens* par CPG

**IR** : Indices de rétentions relatifs aux n-alcane C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne polaire Stabilwax (PEG).

**c** : Comparaison avec les IR cités par la littérature. **s** : comparaison avec des standards (étalons).

### C) Fractionnement de l'HE de *Thymus pallescens*

Le fractionnement de l'huile essentielle du thym de Boussaâda (*Thymus pallescens*) a été réalisé dans le but d'obtenir une fraction très riche en carvacrol auquel on attribue généralement le rôle majeur de l'activité antioxydante. Ainsi, nous avons obtenu deux fractions (F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub>) dont la composition chimique est donnée dans les tableaux 21 et 22.

N°	IR	Composés	Identification	IR littératures
1	1019	tricyclene	c	1017
2	1025	$\alpha$ -Pinene	s	1026
3	1029	$\alpha$ -Thujene	c	1029
4	1070	Camphene	c	1072
5	1113	$\beta$ -Pinene	c	1119
6	1131	Sabinene	c	1132
7	1137	Carène	c	1140
8	1167	$\delta$ -3-Carène	c	1163
9	1171	$\beta$ -Myrcene	c	1173
10	1176	$\alpha$ -Phellandrene	c	1177
11	1187	$\alpha$ -Terpinene	c	1192
12	1206	Limonene	c	1212
13	1217	$\beta$ -Phellandrene	c	1222
14	1236	cis- $\beta$ -Ocimene	c	1246
15	1260	$\gamma$ -Terpinene	c	1261
16	1267	trans- $\beta$ -Ocimene	c	1272
17	1293	p-Cymène	c	1290
18	1312	Terpinolene	c	1300
19	1405	Nonanal	c	1417
20	1459	1-Octen, 3-Ol	c	1462
21	1482	trans-Sabinene Hydrate	c	1482
22	1494	$\alpha$ -Copaene	c	1509
23	1533	$\beta$ -Bourbonene	c	1536
24	1547	Linalool	c	1558
25	1578	cis-Sabinene hydrate	c	1567
27	1604	Thymol methyl ether	c	1611
28	1612	Terpinen-4-ol	c	1613
29	1629	$\beta$ -Caryophyllene	c	1620
30	1676	$\alpha$ -Humulene	c	1687
31	1707	$\gamma$ -Muurolene	c	1704
32	1719	$\alpha$ -Terpineol	c	1723
33	1731	Borneol	c	1732
34	1739	Germacrene D	c	1742
35	1751	$\beta$ -Bisabolene	c	1748
36	1774	$\delta$ -Cadinene	c	1772
37	1777	$\gamma$ -Cadinene	c	1776
38	2160	Spathulenol	c	2145
39	2182	Eugenol	c	2192
40	2198	Thymol	c, s	2312
41	2313	$\alpha$ -Cadinol	c, s	2359
42	2324	Carvaxenol	c, s	2338

Tableau 21: Analyse qualitative de la fraction F<sub>1</sub> de *Thymus pallescens* par CPG

IR : Indices de rétentions relatifs aux n-alcanes C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne polaire Stabilwax (PEG).

c : Comparaison avec les IR cités par la littérature. s : comparaison avec des standards (étalons).

N°	IR	Composés	Identification	IR littératures
1	1074	Camphène	c	1072
2	1136	Sabinène	c	1132
3	1151	Carène	s	1140
4	1164	$\delta$ -3-Carène	c	1163
5	1169	$\beta$ -Myrcène	c	1173
6	1184	$\alpha$ -Terpinène	c	1192
7	1204	Limonène	c	1212
8	1217	$\beta$ -Phellandrene	c	1222
9	1237	cis- $\beta$ -Ocimène	c	1246
10	1254	$\gamma$ -Terpinène	c	1261
11	1273	trans- $\beta$ -Ocimène	c	1272
12	1282	$\rho$ -Cymène	c	1290
13	1292	Terpinolène	c	1300
14	1406	Nonanal	c	1417
15	1466	1-Octen, 3-Ol	c	1462
16	1507	$\alpha$ -Copaène	c	1509
17	1536	$\beta$ -Bourbonène	c	1536
18	1546	Linalool	c	1558
19	1568	cis-Sabinène hydrate	c	1567
20	1606	Thymol methyl ether	c	1611
21	1610	Terpina-4-ol	c	1613
22	1623	$\beta$ -Caryophyllène	c	1620
23	1680	$\alpha$ -Humulène	c	1687
24	1700	$\gamma$ -Muurolène	c	1704
25	1719	$\alpha$ -Terpineol	c	1723
27	1727	Borneol	c	1732
28	1742	Germaçrène D	c	1742
29	1746	$\beta$ -Bisabolène	c	1748
30	1774	$\delta$ -Cadinène	c	1772
31	1778	$\gamma$ -Cadinène	c	1776
32	1797	trans-Cadina-1-4-diene	c	1799
33	1982	Carvacrol methyl ether	c	1976
34	2107	Globulol	c	2105
35	2141	Spathulol	c	2145
36	2191	Eugénol	c	2192
37	2198	T-Cadinol	c	2198
38	2314	Thymol	c, s	2312
39	2317	$\alpha$ -Cadinol	c, s	2339
40	2327	Carvacrol	c, s	2338

Tableau 1: Analyse qualitative de la fraction F<sub>2</sub> de *Thymus pallescens* par CPG

**IR** : Indices de rétentions relatifs aux n-alcane C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne polaire Stabilwax (PEG).

**c** : Comparaison avec les IR cités par la littérature. **s** : comparaison avec des standards (étalons).

### Thymus munbyanus

L'analyse par CPG de l'HE de *Thymus munbyanus* extraite par hydrodistillation sur une colonne capillaire polaire Stabilwax (PEG) a permis d'identifier 42 composés parmi les 64 pics obtenus (Tableau 23).

Tableau 23 : Analyse qualitative de l'HE de *Thymus munbyanus* par CPG

## Huiles essentielles de thym et d'origan

N°	IR	Composés	Identification	IR littératures
1	1035	$\alpha$ -Pinene	c, s	1026
2	1039	$\alpha$ -Thujene	c, s	1029
3	1082	Camphene	s	1072
4	1125	$\beta$ -Pinene	c	1119
5	1138	Sabinene	c	1132
6	1179	$\beta$ -Myrcene	c	1173
7	1184	$\alpha$ -Phellandrene	c	1177
8	1199	$\alpha$ -Terpinene	c	1192
9	1219	Limonene	c	1212
10	1230	$\beta$ -Phellandrene	c	1222
11	1269	$\gamma$ -Terpinene	c	1261
12	1279	trans- $\beta$ -Ocimene	c	1272
13	1299	$\rho$ -Cymène	c	1290
14	1307	Terpinolene	c	1300
15	1409	Nonanal	c	1417
16	1466	1-Octen-3-ol	c	1462
17	1486	trans-Sabinene Hydrate	c	1482
18	1486	$\alpha$ -Copaene	c	1509
19	1541	$\beta$ -Bourbonene	c	1536
20	1562	Linalool	c	1558
21	1571	cis-Sabinene hydrate	c	1567
22	1597	$\beta$ -Elemene	c	1600
23	1617	Terpinen-4-ol	c	1613
24	1626	Thymol Methylether	c	1611
25	1630	$\square$ -Caryophyllene	c	1620
27	1692	$\alpha$ -Humulene	c	1687
28	1706	$\gamma$ -Muurolene	c	1704
29	1713	$\alpha$ -Muurolene	c	1721
30	1721	$\alpha$ -Terpineol	c	1723
31	1729	Germacrene D	c	1742
32	1738	$\beta$ -Bisabolene	c	1748
33	1770	$\delta$ -Cadinene	c	1772
34	1783	$\gamma$ -Cadinene	c	1776
35	1790	Geranyl acetate	c	1778
36	1796	trans-Cadina-1-4-diene	c	1799
37	1830	Cuminaldehyde	c	1813
38	1874	Geraniol	c	1855
39	2058	Caryophyllene oxide	c	2051
40	2159	Eugenol	c	2192
41	2317	Thymol	c, s	2312
42	2339	Carvacrol	c, s	2338

**IR** : Indices de rétentions relatifs aux n-alcanes C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne polaire Stabilwax (PEG).

**c** : Comparaison avec les IR cités par la littérature. **s** : comparaison avec des standards (étalons).



### Thymus dreatensis

L'analyse par CPG de l'HE de *Thymus dreatensis* extraite par hydrodistillation a permis d'identifier 38 composés parmi les 45 pics obtenus (Tableau 24).

Tableau 24 : Analyse qualitative de l'HE de *Thymus dreatensis* par CPG

N°	IR	Composés	Identification	IR littératures
1	1032	$\alpha$ -Pinene	c, s	1026
2	1035	$\alpha$ -Thujene	c, s	1029
3	1079	Camphene	s	1072
4	1122	$\beta$ -Pinene	c	1119
5	1134	Sabinene	c	1132
6	1175	$\beta$ -Myrcene	c	1173
7	1180	$\alpha$ -Phellandrene	c	1177
8	1195	$\alpha$ -Terpinene	c	1192
9	1215	Limonene	c	1212
10	1226	$\beta$ -Phellandrene	c	1222
11	1264	$\gamma$ -Terpinene	c	1261
12	1276	trans- $\beta$ -Ocimene	c	1272
13	1294	$\rho$ -Cymène	c	1290
14	1304	Terpinolene	c	1300
15	1406	Nonanal	c	1417
16	1464	1-Octen-3-ol	c	1462
17	1484	trans-Sabinene Hydrate	c	1482
18	1538	$\beta$ -Bourbonene	c	1536
19	1562	Linalool	c	1558
20	1570	cis-Sabinene hydrate	c	1567
21	1616	Thymol Methylether	c	1611
22	1626	Terpinen-4-ol	c	1613
23	1688	$\alpha$ -Humulene	c	1687
24	1718	$\alpha$ -Muurolene	c	1721
25	1727	$\alpha$ -Terpineol	c	1723
27	1736	Borneol	c	1732
28	1745	GermacreneD	c	1742
29	1751	$\beta$ -Bisabolene	c	1748
30	1781	$\delta$ -Cadinene	c	1772
31	1787	$\gamma$ -Cadinene	c	1776
32	1797	trans-Cadina-1,4-diene	c	1799
33	1827	Cuminaldehyde	c	1813
34	1844	Nerol	c	1830
35	1874	Geraniol	c	1855
36	2055	Caryophyllene oxide	c	2051
37	2309	Thymol	c, s	2312
38	2337	Carvacrol	c, s	2338

IR : Indice de rétentions relatifs aux n-alcanes C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne polaire Stabilwax (PEG).

**c** : Comparaison avec les IR cités par la littérature. **s** : comparaison avec des standards (étalons).

### Origanum floribundum

Parmi les 31 pics fournis par l'analyse qualitative de l'huile essentielle de l'origan cueilli dans la région de Chréa, 29 composés ont pu être identifiés (Tableau 25).

**Tableau 25: Analyse qualitative de l'HE d'origan de Chréapar CPG**

N°	IR	Composés	Identification	IR littératures
1	1033	$\alpha$ -Pinene	c, s	1032
2	1037	$\alpha$ -Thujene	c, s	1035
3	1080	Camphene	s	1072
4	1122	$\beta$ -Pinene	c	1119
5	1135	Sabinene	c	1132
6	1175	$\beta$ -Myrcene	c	1173
7	1180	$\alpha$ -Phellandrene	c	1177
8	1196	$\alpha$ -Terpinene	c	1192
9	1216	Limonene	c	1212
10	1227	1-8-Cineole	c	1223
11	1267	$\gamma$ -Terpinene	c	1261
12	1276	trans- $\beta$ -Ocimene	c	1272
13	1295	$\rho$ -Cymène	c	1290
14	1304	Terpinolene	c	1300
15	1463	1-Octen-3-ol	c	1462
16	1483	trans-Sabinene Hydrate	c	1482
17	1538	$\beta$ -Bourbonene	c	1536
18	1559	Linalool	c	1558
19	1568	cis-Sabinene hydrate	c	1567
20	1614	Thymol methylether	c	1611
21	1623	Terpinen-4-ol	c	1613
22	1627	$\square$ -Caryophyllene	c	1620
23	1667	$\alpha$ -Humulene	c	1687
24	1727	Germacrene D	c	1742
25	1735	$\beta$ -Bisabolene	c	1748
27	2054	Caryophyllene oxide	c	2051
28	2314	Thymol	c, s	2312
29	2337	Carvacrol	c, s	2338

**IR** : Indice de rétentions relatifs aux n-alcanes C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne polaire Stabilwax (PEG).

**c** : Comparaison avec les IR cités par la littérature. **s** : comparaison avec des standards (étalons).

### Analyse semi-quantitative des HE par CG/SM

L'identification des composés des huiles essentielles par CG/SM a été essentiellement basée sur la comparaison du spectre de masse de la molécule inconnue à celui d'un

composé pur fourni par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse.

### Thymus pallescens

Après injection de l'huile essentielle du thym de Boussaâda selon les conditions opératoires citées précédemment, 68 composés ont pu être identifiés (96,1 %) avec une concentration élevée en carvacrol (46,9 %). Les résultats obtenus sont donnés le tableau 26 et la figure 20.

**IR** : Indices de rétentions relatifs aux n-alcanes C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne capillaire non polaire HP 5MS.

**c** : Comparaison avec les IR cités par la littérature. **e** : comparaison avec les spectres de masses fournis par la librairie du spectromètre de masse. **t** = concentration inférieure à 0.05 %.

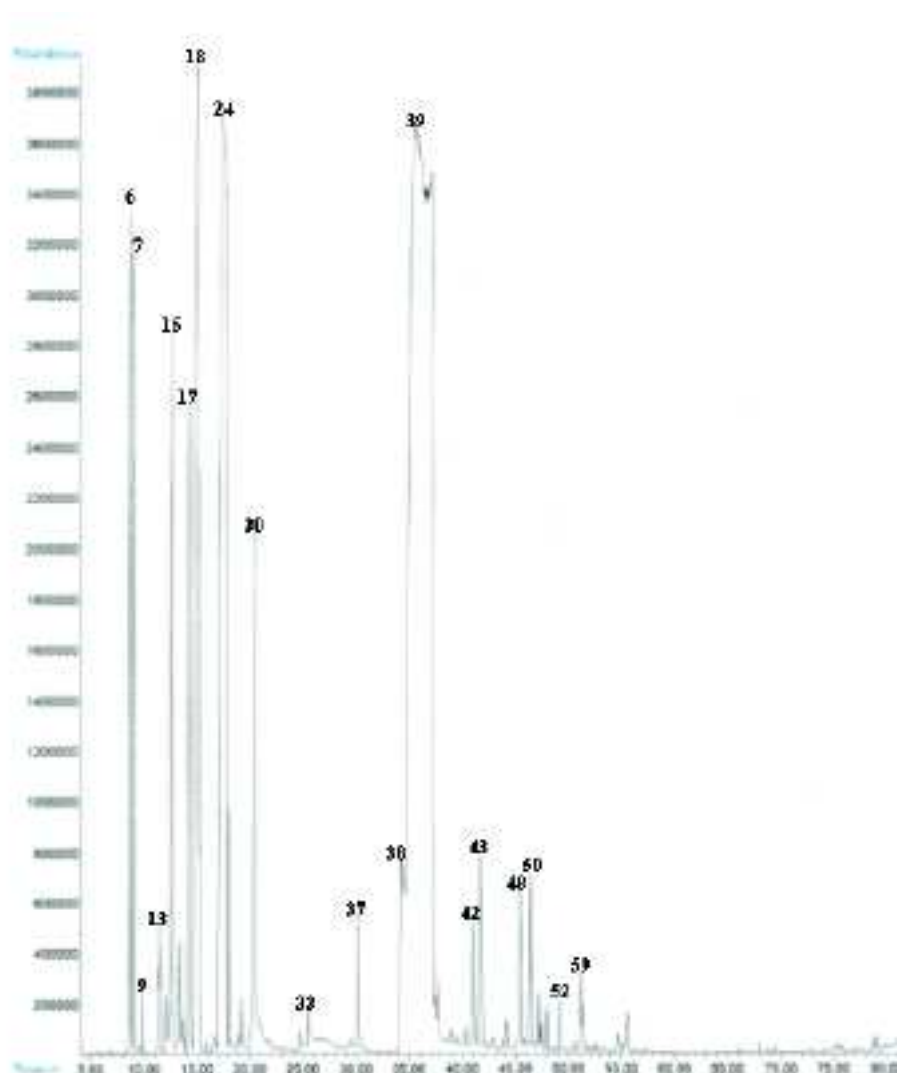


Figure 20 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Thymus pallescens*

D'après ces résultats, il apparaît que l'huile essentielle du *Thymus pallescens* est caractérisée par la dominance d'un composé phénolique : carvacrol avec une teneur de 46,9 % suivie par deux hydrocarbures monoterpéniques : p-Cymène,  $\alpha$ -Terpinene avec des

teneurs de 10 et 14,2 % respectivement. Ces résultats sont proches de ceux rapportés par **Chikhouné (2004)** en travaillant sur le thym de Tablât (*Thymus pallescens*) (Tableau 27).

**Tableau 27: Analyse semi quantitative d' H.E. de *Thymus pallescens* de Tablat(Chikhouné, 2004)**

N°	Composés	Concentration (%)
1	Ethyle acétate	2,218
2	$\alpha$ - Thujene	2,140
3	$\alpha$ – Pinène	3,993
4	$\beta$ - Pinène	2,060
5	Myrcène	0,460
6	$\alpha$ – Phellandrene	0,109
7	$\alpha$ – Terpinène	2,792
8	<b><math>\rho</math>-Cymène</b>	<b>9,577</b>
9	Limonène	1,915
10	<b><math>\gamma</math>- Terpinène</b>	<b>14,787</b>
11	Linalool	1,751
12	Nerol	0,152
13	Thymol	0,940
14	<b>Carvacrol</b>	<b>50,936</b>
15	Caryophyllene	0,454
	<b>Total</b>	<b>89,926</b>

### **Fractionnement de l'HE de *Thymus pallescens***

Les résultats de l'analyse semi quantitative des deux fractions F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub> sont résumés dans le tableau 28 et figure 21.

N°	Composé	IR	%		Identification
			F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	
1	Méthyl 2-méthylbutyrate	-	t	-	c,e
2	$\alpha$ -Thujène	925	<b>4,0</b>	0,1	c,e
3	$\alpha$ -Pinène	939	2,9	0,1	c,e
4	Camphène	951	0,2	t	c,e
5	Sabinène	971	0,2	t	c,e
6	$\beta$ -Pinène	978	0,5	t	c,e
7	1-Octan-3-OL	986	-	0,1	c,e
8	3-Octanone	987	-	t	c,e
9	$\beta$ -Myrcène	991	2,6	0,2	c,e
10	$\beta$ -Ostéol	1001	-	t	c,e
11	$\alpha$ -Phellandène	1007	0,4	0,1	c,e
12	5-3-Carène	1019	t	t	c,e
13	$\alpha$ -Terpène	<b>1017</b>	<b>3,9</b>	0,6	c,e
14	$\rho$ -Cymène	<b>1026</b>	<b>10,5</b>	<b>4,7</b>	c,e
15	$\beta$ -Phellandène	<b>1045</b>	-	0,2	c,e
16	Limonène	1044	1,3	-	c,e
17	cis- $\rho$ -Cimène	1046	-	t	c,e
18	$\gamma$ -Terpène	<b>1060</b>	<b>25,3</b>	<b>5,4</b>	c,e
	cis-Sabinène hydrate	1075	-	0,1	c,e
20	trans- $\beta$ -Ostéol	1075	0,2	-	c,e
21	1-Nonen-5-OL	1088	-	t	c,e
22	Terpinolène	1093	t	0,1	c,e
23	$\rho$ -Cymène	1095	-	t	c,e
24	Linalol	<b>1104</b>	1,5	-	c,e
25	Campholène aldéhyde	-	-	t	c,e
26	Borneol	1166	-	0,1	c,e
27	4-Terpénol	1177	t	0,1	c,e
28	$\alpha$ -Terpinol	1190	-	t	c,e
29	Thymol méthylether	1235	t	0,3	c,e
30	Dihydrocarvone	1229	-	t	c,e
31	Thymol	1297	t	0,1	c,e
32	Carvacrol	<b>1317</b>	<b>43,1</b>	<b>81,4</b>	c,e
33	$\alpha$ -Copaène	1316	-	0,1	c,e
34	$\alpha$ -Gujunone	1428	0,1	0,4	c,e
35	$\beta$ -Caryophyllène	1417	0,2	0,7	c,e
36	$\beta$ -Gurjunène	1428	-	t	c,e
37	Acornéolène	1439	-	0,1	c,e
38	Obermanène D	1480	-	0,1	c,e
39	Lodène	1483	-	0,1	c,e
40	$\alpha$ -Mumolène	1497	-	t	c,e
41	$\beta$ -Bambolène	1490	-	0,1	c,e
42	$\gamma$ -Cadinène	1511	-	0,1	c,e
43	$\delta$ -Cadinène	1519	-	0,2	c,e
44	cis- $\alpha$ -Eisobornène	1540	-	0,1	c,e
45	Spathulolène	1571	-	0,4	c,e
46	Caryophyllène oxide	1578	-	0,2	c,e
	<b>Total</b>		<b>94,9</b>	<b>96,2</b>	
	Hydrocarbures monoterpéniques		52,0	11,5	
	Dérivés monoterpéniques oxygénés		44,6	82,1	
	Hydrocarbures sesquiterpéniques		0,3	2,0	
	Dérivés sesquiterpéniques oxygénés		0,0	0,6	
	Autres		0,0	0,1	

Tableau 28 : Analyse semi quantitative des fractions F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub> de l'HE de *Thymus palleescens* par CG/SM

IR : Indices de rétentions relatifs aux n-alcanes C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne capillaire non polaire HP 5MS.

c : Comparaison avec les IR cités par la littérature. e : comparaison avec les spectres de masses fournis par la librairie du spectromètre de masse. t = concentration inférieure à 0.05 %.

D'après les résultats du tableau 28, il apparaît que la F<sub>1</sub> est caractérisée par la dominance des monoterpènes hydrocarbonés (52 %) tandis que la F<sub>2</sub> est dominée par les monoterpènes oxygénés (82,1 %) tandis que les sesquiterpènes hydrocarbonés et sesquiterpènes oxygénés sont à des taux très faibles chez la F<sub>2</sub> et entièrement absents au niveau de la F<sub>1</sub>.

Le composé majoritaire qui caractérise les deux fractions est le carvacrol avec une teneur proche de celle enregistrée avec l'HE de *T. pallescens* pour la F<sub>1</sub> (43,1 %) et nettement supérieure pour la F<sub>2</sub> (81,4 %). Les teneurs en composés :  $\alpha$ -Thujène,  $\alpha$ -Pinène,  $\beta$ -Terpinène, *p*-Cymène,  $\beta$ -Terpinène et Linalool de la F<sub>1</sub> sont largement supérieures à ceux observés au niveau de la F<sub>2</sub> et de l'HE complète.

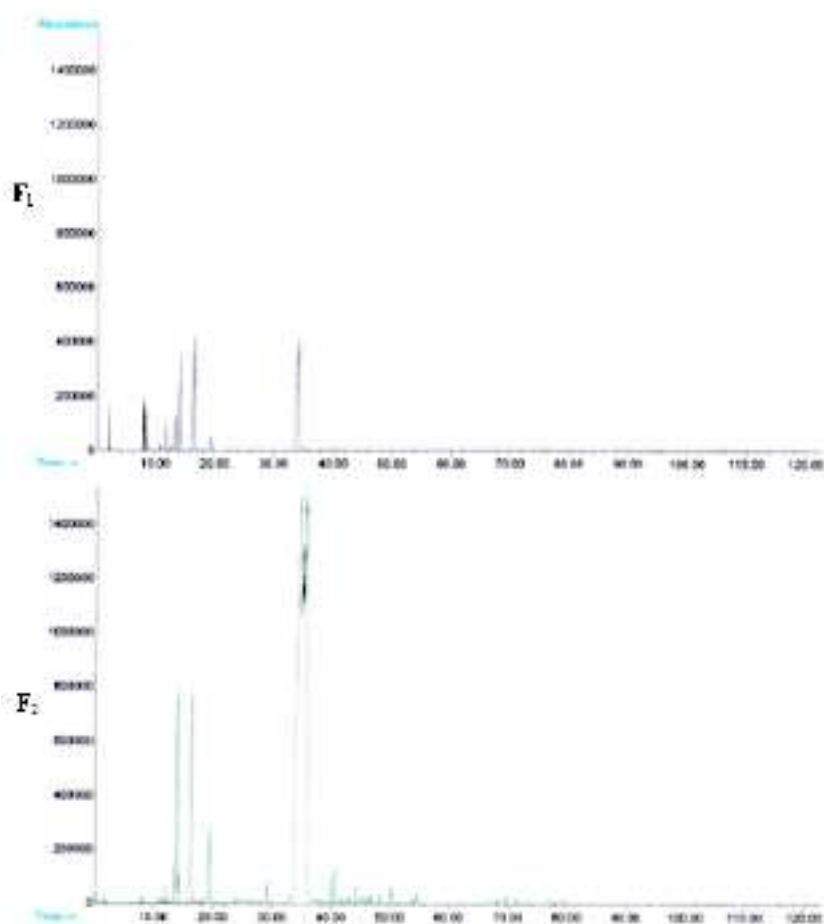


Figure 21 : Chromatogrammes des fractions F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub> obtenus par GC/SM

### Thymus dreatensis

L'analyse chromatographique de l'HE de *Thymus dreatensis* par CG/SM a permis d'identifier 61 composés (96,8 %) avec une teneur élevée en Linalool (30,4 %). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 29 et la figure 22.

Tableau 29: Analyse semi quantitative de l'HE de *Thymus dreatensis* par CG/SM

N°	Composés	IR	%	Identification
1	$\alpha$ -Thujene	925	0.2	c,e
2	$\alpha$ -Pinene	939	1.2	c,e
3	Camphene	951	t	c,e
4	Sabinene	973	0.1	c,e
5	$\beta$ -Pinene	978	0.1	c,e
6	1-Octen-3-ol	986	0.5	c,e
7	3-Octanone	987	t	c,e
8	$\beta$ -Myrcene	992	2.5	c,e
9	3-Octanol	997	0.1	c,e
10	$\alpha$ -Phellandrene	1007	0.1	c,e
11	$\delta$ -3-Carene	1009	t	c,e,s
12	$\alpha$ -Terpinene	1017	0.4	c,e
13	$\rho$ -Cymène	1026	4	c,e,s
14	Limonene	1044	0.3	c,e
15	$\beta$ -Phellandrene	1045	t	c,e
16	trans- $\beta$ -Ocimene	1052	t	c,e
17	$\gamma$ -Terpinene	1060	4.4	c,e
18	cis-Sabinene hydrate	1075	0.1	c,e
19	1-Nonen-3-ol	1088	t	c,e
20	Terpinolene	1093	t	c,e,s
21	Linalool	1104	30.4	c,e,s
22	cis-Verbenol	1145	t	c,e
23	trans-chrysanthemal	1149	0.1	c,e
24	Borneol	1166	t	c,e
25	Terpinen-4-ol	1177	0.1	c,e
26	$\alpha$ -Terpineol	1190	2.5	c,e
27	cis-Dihydrocarvone	1197	0.1	c,e
28	trans-Dihydrocervone	1200	t	c,e
29	Nerol	1230	0.2	c,e
30	Thymol Methylether	1235	0.7	c,e
31	Cuminaldehyde	1238	0.3	c,e
32	Neral	1242	0.6	c,e
33	Geraniol	1273	19.6	c,e
34	Thymol	1297	20.2	c,e
35	Carvacrol	1317	1.1	c,e
36	$\alpha$ -Copaene	1376	t	c,e
37	$\beta$ -Bourbonene	1384	0.1	c,e
38	Geranyl acetate	1385	0.3	c,e
39	$\alpha$ -Gurjunene	1408	0.1	c,e
40	$\beta$ -Caryophyllene	1417	3	c,e
41	$\beta$ -Gurjunene	1428	0.1	c,e
42	trans- $\alpha$ -Bergamotene	1438	t	c,e
43	Aromdendrene	1439	t	c,e
44	$\alpha$ -Humulene	1452	0.1	c,e
45	Alloaromadendrene	1457	0.1	c,e
46	GermacreneD	1480	1.8	c,e
47	Ledene	1485	t	c,e
48	Bicyclogermcrene	1495	t	c,e
49	$\alpha$ -Muurolene	1497	t	c,e
50	$\beta$ -Bisabolene	1506	0.7	c,e
51	$\gamma$ -Cadinene	1511	t	c,e
52	$\delta$ -Cadinene	1519	0.1	c,e
53	$\beta$ -Sesquiphellandrene	1525	t	c,e
54	trans-Cadina-1,4-diene	1527	t	c,e
55	cis- $\alpha$ -Bisabolene	1540	0.1	c,e
56	Germacrene D-4-ol	1569	0.2	c,e

**IR** : Indices de rétentions relatifs aux n-alcanes C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> sur une colonne capillaire non polaire HP 5MS.

**c** : Comparaison avec les IR cités par la littérature. **e** : comparaison avec les spectres de masses fournis par la librairie du spectromètre de masse. **s** : comparaison avec des standards (étalons). **t** = concentration inférieure à 0.05 %.

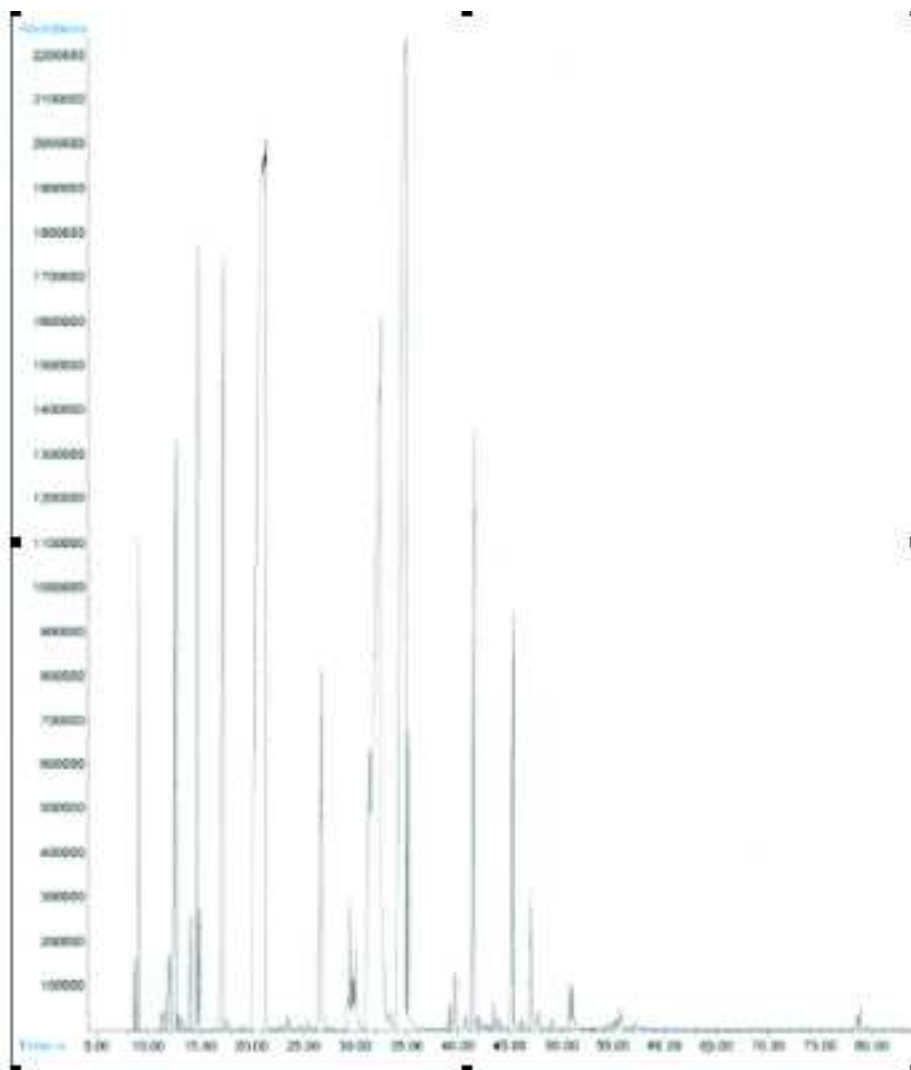


Figure 22 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Thymus dreatensis*

D'après le Tableau 29, l'HE du thym cueilli dans la région de Takoucht est caractérisée par la dominance de trois composés à savoir: le Linalool, le Géraniol et le Thymol avec des pourcentages de 30,4 %, 19,6 et 20,2 % respectivement suivie ensuite par le  $\gamma$ -Terpinene, le  $p$ -Cymène, le  $\beta$ -Caryophyllène et l' $\alpha$ -Terpineol avec des teneurs de 4.4, 4, 3 et 2.5 %.

### **Thymus munbyanus**

L'analyse semi-quantitative de l'HE du thym de Bejaia (*Thymus munbyanus*) par CG/SM a permis d'identifier 62 composés (97,1 %). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 30 et la figure 23.



N°R	Composé R	IR	IR	Concentration
10	Méthylacétaléol	7650	ts	c,s
16	(E)-3-Hexenal	8300	ts	c,s
18	3-Hydroxycetone	8370	ts	c,s
40	α-Thujone	9250	1.50	c,s,t
50	α-Pinène	9300	0.60	c,s,t
60	Camphène	9510	ts	c,s,t
70	Solénol	9730	ts	c,s,t
80	β-Pinène	9780	10	c,s,t
90	1-Cétine-3-ol	9800	0.30	c,s
100	β-Bisphénol	9920	7.10	c,s,t
110	α-Pinadiénol	10070	0.30	c,s,t
120	α-Terpinène	10170	0.50	c,s,t
130	γ-Cymène	10260	14.30	c,s,t
140	Limonène	10440	0.30	c,s,t
150	β-Pinadiénol	10450	0.30	c,s,t
160	1,8-Cineole	10460	0.10	c,s,t
170	cis-β-Cimène	10470	ts	c,s
180	trans-β-Cimène	10520	ts	c,s
190	γ-Terpinène	10600	10.10	c,s,t
200	α-Cadinène Hydraté	10750	0.50	c,s
210	Terpinolène	10930	0.30	c,s,t
220	γ-Cyménol	10930	0.10	c,s
230	trans-Solénol Hydraté	11010	ts	c,s
240	Linalol	11040	2.30	c,s,t
250	Bornol	11660	ts	c,s,t
260	Terpinène-4-ol	11770	0.10	c,s,t
270	α-Terpinol	11900	ts	c,s,t
280	Thymol méthylethéré	12350	1.40	c,s
290	Carvacrol méthylethéré	12450	0.30	c,s
300	Thymol	12770	37.70	c,s,t
310	Carvacrol	13170	8.40	c,s,t
320	Eugénol	13180	ts	c,s
330	α-Copaène	13760	0.10	c,s
340	β-Bourbonol	13810	0.10	c,s
350	Geranylacétate	13930	0.20	c,s
360	β-Bisphénol	13940	ts	c,s
370	cis-Farnésol	14060	ts	c,s
380	β-Caryophyllène	14170	2.50	c,s,t
390	trans-β-Bisphénol	14380	ts	c,s
400	α-Humulol	14520	0.20	c,s
410	1,6-Triméthylcyclo(7,3,0)octan-3-one	14540	0.20	c,s
420	γ-Hexenal	14740	ts	c,s
430	Geraniol	14800	10	c,s
440	Epiauronepenthylacétate	14830	ts	c,s
450	Valériol	14900	ts	c,s
460	α-Humulol	14970	0.10	c,s
470	β-Bisphénol	15060	0.10	c,s
480	γ-Cadinène	15110	0.10	c,s
490	β-Cadinène	15190	0.20	c,s
500	trans-Cétine-1-4-diol	15270	ts	c,s
510	α-Cadinol	15330	ts	c,s
520	α-Cadinol	15360	ts	c,s
530	Claryphylène Oxidol	15720	0.60	c,s,t
540	Claryphylène Oxidol	16290	ts	c,s
550	γ-Oxétol	16390	ts	c,s
560	γ-Bisphénol	16400	ts	c,s
570	β-Eudesmol	16450	0.10	c,s
580	α-Cadinol	16500	0.10	c,s
590	Octadécane	18010	ts	c,s,t
600	Palmitic acid methyl ester	19110	ts	c,s
610	Lactic acid methyl ester	20890	ts	c,s
620	Oleic acid methyl ester	21060	ts	c,s
0	Total (C18)	0	97.10	0
0	Hydrocarbures monoaromatiques	0	40.30	0
0	Dérivés azotés/aromatiques oxygénés	0	30.30	0
0	Hydrocarbures monoaromatiques	0	4.30	0
0	Dérivés azotés/aromatiques oxygénés	0	0.30	0
0	Autres	0	0.40	0

Tableau 30: Analyse semi quantitative de l'HE de *Thymus munbyanus* par CG/SM

IR : Indices de rétentions relatifs aux n-alcanes C7 - C24 sur une colonne capillaire non polaire HP 5MS.

c : Comparaison avec les IR cités par la littérature. e : comparaison avec les spectres de masses fournis par la librairie du spectromètre de masse. .s : comparaison avec des standards (étalons). t = concentration inférieure à 0.05 %.

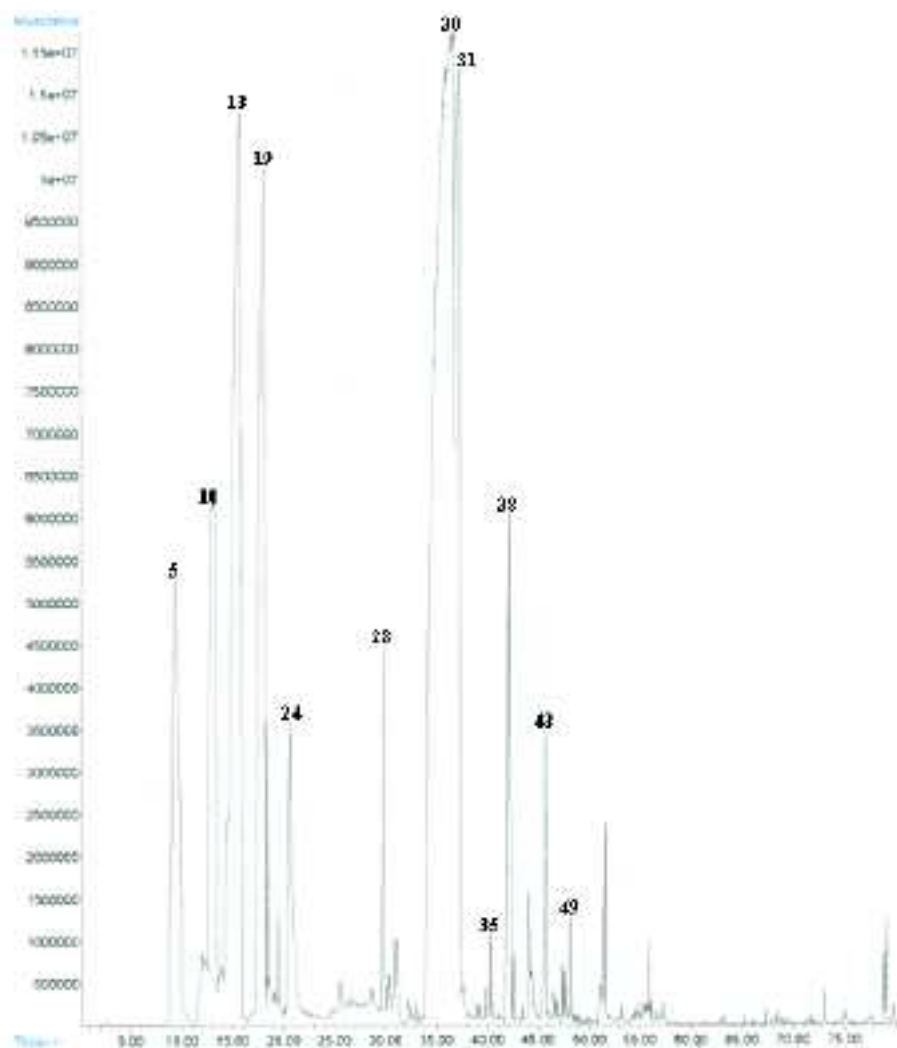


Figure 23 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Thymus munbyanus*

L'huile essentielle du thym de Bejaia est caractérisée par la présence de 5 composés majoritaires: le Thymol, le p-Cymène, le  $\gamma$ - Terpinène, le Carvacrol et le  $\beta$ -Myrcene avec des concentrations de 37.7, 14.2, 10.1, 8.4, 7.1 % respectivement.

Le tableau 31 montre les principaux composés de certaines espèces du genre *Thymus*.

Tableau 31: Principaux composés de certaines espèces du genre *Thymus*

Composés	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
α-pinène	0,3	2,1	1,1	4,3	0,3
Camphène	0,2	1,8	0,9	-	0,3
Sabinène	0,2	0,4	0,1	-	-
α-terpinène	1,0	-	1,5	0,3	0,9
ρ-Cymène	7,3	0,3	16,7	8,0	10,0
Limonène	-	0,7	0,6	-	-
γ-Terpinene	4,5	0,1	12,5	3,2	6,3
Linalool	2,0	16,6	2,0	5,6	-
Thymol	38,2	-	11,3	0,7	36,5
Carvacrol	26,3	-	29,3	28,0	29,8

T<sub>1</sub> : *T. pallscens* de Tablat (Bousbia, 2004);

T<sub>2</sub> : *T. camphoratus* de Algarve- Portugal (Miguel et al., 2004) ;

T<sub>3</sub> : *T. vulgaris* de France (Pibiri, 2006) ;

T<sub>4</sub> : *T. numidicus* de Yakourène (Tizi ousou) (Fadli et Kessi, 2005) ;

T<sub>5</sub> : *T. spathulifolius* de Sivas, Turkey (Sokmen et al. , 2004).

### **Origanum floribundum**

L'analyse chromatographique par CG/SM de l'HE de l'origan provenant de la région de Chréa (*Origanum floribundum*) a permis d'identifier 55 composés (96,6 %). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 32 et la figure 24.

n	Composés n	IRn	%n	Identificationsn
1n	Méthyl isovalératen	765n	0.1n	c,sn
2n	(E)-2-Hexenal n	850n	to	c,sn
3n	3-hexen-1-oln	862n	to	c,sn
4n	3-Heptanone n	887n	to	c,sn
5n	Tricyclenenn	923n	to	c,sn
6n	$\alpha$ -Thujenenn	925n	3.7n	c,sn
7n	$\alpha$ -Pinenenn	939n	2.2n	c,sn
8n	Camphrenenn	951n	0.1n	c,sn
9n	Sabinenenn	973n	0.2n	c,sn
10n	$\beta$ - Pinenenn	978n	0.6n	c,sn
11n	1-Octen-3-olenn	986n	n	c,sn
12n	$\beta$ -Myrcenenn	992n	2.9n	c,sn
13n	$\alpha$ -Terpinenenn	1017n	2.5n	c,sn
14n	$\beta$ -Cyménenn	1026n	18.5n	c,sn
15n	Limonenn n	1044n	to	c,sn
16n	$\beta$ - Phellandrenenn	1045n	n	c,sn

Tableau 32: Analyse semi quantitative de l'HE de l'origan de Chréa par CG/SMN°

**IR:** Indices de rétentions relatifs aux n-alcanes C7 - C24 sur une colonne capillaire non polaire HP 5MS.

**c :** Comparaison avec les IR cités par la littérature. **e :** comparaison avec les spectres de masses fournis par la librairie du spectromètre de masse. **.s :** comparaison avec des standards (étalons). **t =** concentration inférieure à 0.05 %.

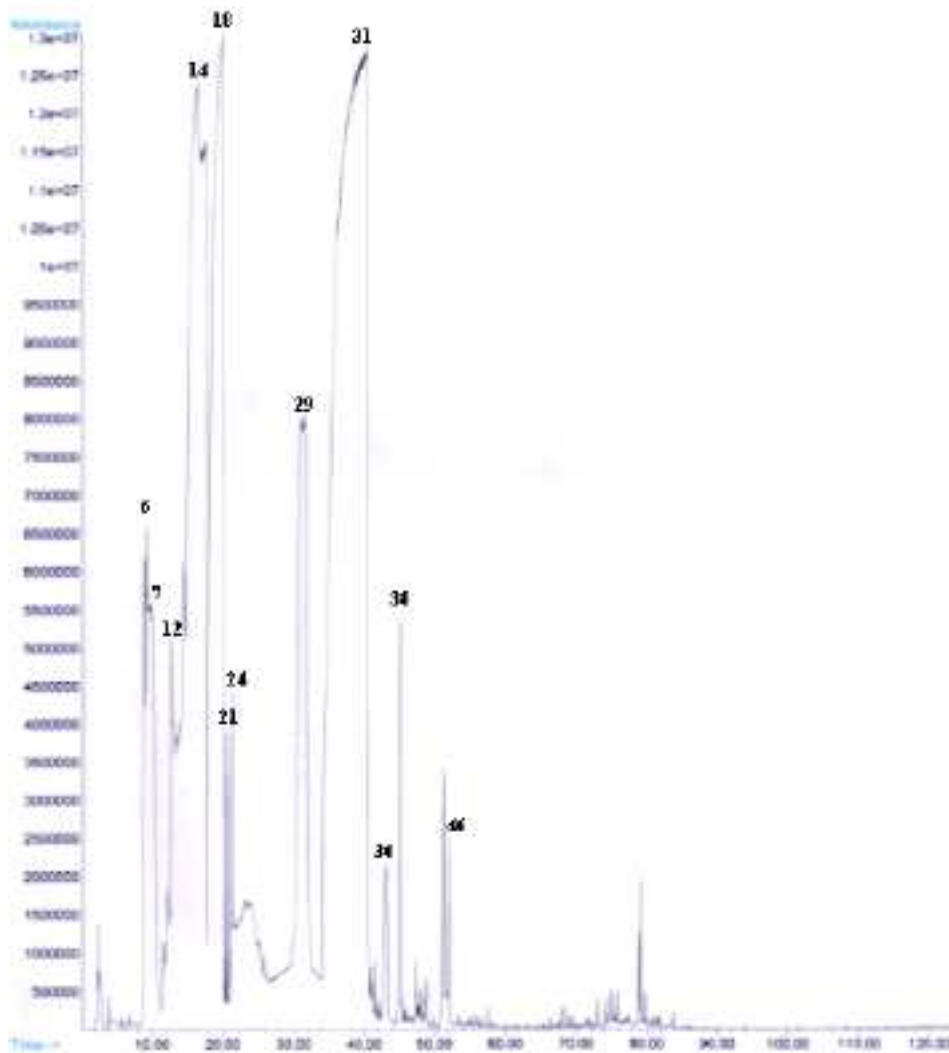


Figure 24: Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Origanum floribundum*

D'après les résultats du tableau 32, il apparaît que l'huile essentielle de cette espèce d'origan est caractérisée par la dominance d'un composé phénolique : le carvacrol (29,6 %) suivie par deux hydrocarbures monoterpéniques : *p*-Cymène,  $\alpha$ -Terpinène avec des teneurs de 18,5 et 13,7 respectivement. Par contre le thymol est présent avec uniquement 8,4 %.

**Fadli et Kessi, (2005)**, travaillant sur une population d'origan de la même espèce cueillie à Hammam Melouane, ont signalé la présence du thymol (isomère du carvacrol) comme étant le composé majoritaire avec une proportion de 27,26 % (Tableau 33).

Tableau 33: Analyse semi-quantitative de HE de l'origan par CG/SM d'après Fadli et Kessi (2005)

N°	Composés	%
1	$\alpha$ -Thujene	3,15
2	$\alpha$ -Pinene	1,80
3	Sabinene	0,69 -
4	$\beta$ -Pinene	
5	$\beta$ -Myrcene	4,80
6	$\alpha$ -Terpinene	2,07
7	p-Cymène	24,90
8	$\gamma$ -Terpinene	22,29
9	$\alpha$ -Terpinolene	0,35 -
10	Dehydro p-Cymène	
11	Linalool	2,36
12	4-Terpineol	0,15
13	$\alpha$ - Terpeneol	0,39
14	Thymol methyl ether	0,61
15	Carvacrol methyl ether	3,64
16	Thymol	27,26
17	Carvacrol	1,56
18	$\beta$ -Caryophyllene	1,45
19	$\alpha$ - Humulene	0,38
20	Bicyclogermacrene	0,12
21	$\beta$ - Bisabolene	0,19
22	$\delta$ -Cadinene	0,23
23	Caryophyllene oxide	0,37

Le tableau 34 montre les principaux composés de certaines espèces du genre *Origanum*.

Tableau 34: Principaux composés de certaines espèces du genre *Origanum*

Composés	O <sub>1</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>	O <sub>4</sub>	O <sub>5</sub>
$\alpha$ -Thujène	0,9	1,2	0,3	2,2	0,5
$\alpha$ -Pinène	0,5	0,8	0,7	1,0	0,5
$\beta$ -Myrcène	1,7	0,9	1,6	0,4	1,4
$\alpha$ -Terpinène	2,2	2,8	15,0	3,1	1,7
p-Cymène	15,1	12,5	11,2	14,7	10,5
Limonène	1,1	0,5	0,3	0,4	-
$\gamma$ -Terpinene	27,5	11,4	13,4	16,6	14,8
Linalool	1,1	0,4	1,0	1,4	1,0
Thymol	35,0	33,4	6,6	28,7	20,4
Carvacrol	6,4	17,0	47,0	22,8	40,5

- O<sub>1</sub> : *O. glandulosum* de Larbâa (Bousbia, 2004) ;
- O<sub>2</sub> : *O. vulgare* d'Italie (Giamperie et al. , 2002) ;
- O<sub>3</sub> : *O. glandulosum* de Setif (Belhattab et al ., 2005) ;
- O<sub>4</sub> : *O. glandulosum* deBejaia (Chikhoun, 2004) ;
- O<sub>5</sub> : *O. floribundum* de Chréa (Azzoudj, 1999).

Le tableau 35 récapitule la composition chimique des huiles essentielles des 4 espèces étudiées et la figure 25 le pourcentage des différentes classes chimiques constituant chaque HE.

IR	Composé	IR	Of	Tm	Tp	Td
1	Alcane	30	41	1	-	-
2	Alcane	147	-	-	-	-
3	Alcane	151	1	1	1	1
4	Alcane	162	1	-	-	-
5	Alcane	167	-	-	-	-
6	Alcane	187	1	1	1	1
7	Alcane	192	1	1	1	1
8	Alcane	192	13	13	13	13
9	Alcane	193	1	1	1	1
10	Alcane	193	24	24	24	24
11	Alcane	194	1	1	1	1
12	Alcane	192	-	-	-	-
13	Alcane	193	42	42	42	42
14	Alcane	193	45	45	45	45
15	Alcane	196	1	1	1	1
16	Alcane	197	-	-	-	-
17	Alcane	197	13	13	13	13
18	Alcane	197	-	-	-	-
19	Alcane	197	-	-	-	-
20	Alcane	197	1	1	1	1
21	Alcane	197	1	1	1	1
22	Alcane	197	13	13	13	13
23	Alcane	197	13	13	13	13
24	Alcane	197	13	13	13	13
25	Alcane	197	13	13	13	13
26	Alcane	197	13	13	13	13
27	Alcane	197	13	13	13	13
28	Alcane	197	13	13	13	13
29	Alcane	197	13	13	13	13
30	Alcane	197	13	13	13	13
31	Alcane	197	13	13	13	13
32	Alcane	197	13	13	13	13
33	Alcane	197	13	13	13	13
34	Alcane	197	13	13	13	13
35	Alcane	197	13	13	13	13
36	Alcane	197	13	13	13	13
37	Alcane	197	13	13	13	13
38	Alcane	197	13	13	13	13
39	Alcane	197	13	13	13	13
40	Alcane	197	13	13	13	13
41	Alcane	197	13	13	13	13
42	Alcane	197	13	13	13	13
43	Alcane	197	13	13	13	13
44	Alcane	197	13	13	13	13
45	Alcane	197	13	13	13	13
46	Alcane	197	13	13	13	13
47	Alcane	197	13	13	13	13
48	Alcane	197	13	13	13	13
49	Alcane	197	13	13	13	13
50	Alcane	197	13	13	13	13
51	Alcane	197	13	13	13	13
52	Alcane	197	13	13	13	13
53	Alcane	197	13	13	13	13
54	Alcane	197	13	13	13	13
55	Alcane	197	13	13	13	13
56	Alcane	197	13	13	13	13
57	Alcane	197	13	13	13	13
58	Alcane	197	13	13	13	13
59	Alcane	197	13	13	13	13
60	Alcane	197	13	13	13	13
61	Alcane	197	13	13	13	13
62	Alcane	197	13	13	13	13
63	Alcane	197	13	13	13	13
64	Alcane	197	13	13	13	13
65	Alcane	197	13	13	13	13
66	Alcane	197	13	13	13	13
67	Alcane	197	13	13	13	13
68	Alcane	197	13	13	13	13
69	Alcane	197	13	13	13	13
70	Alcane	197	13	13	13	13
71	Alcane	197	13	13	13	13
72	Alcane	197	13	13	13	13
73	Alcane	197	13	13	13	13
74	Alcane	197	13	13	13	13
75	Alcane	197	13	13	13	13
76	Alcane	197	13	13	13	13
77	Alcane	197	13	13	13	13
78	Alcane	197	13	13	13	13
79	Alcane	197	13	13	13	13
80	Alcane	197	13	13	13	13
81	Alcane	197	13	13	13	13
82	Alcane	197	13	13	13	13
83	Alcane	197	13	13	13	13
84	Alcane	197	13	13	13	13
85	Alcane	197	13	13	13	13
86	Alcane	197	13	13	13	13
87	Alcane	197	13	13	13	13
88	Alcane	197	13	13	13	13
89	Alcane	197	13	13	13	13
90	Alcane	197	13	13	13	13
91	Alcane	197	13	13	13	13
92	Alcane	197	13	13	13	13
93	Alcane	197	13	13	13	13
94	Alcane	197	13	13	13	13
95	Alcane	197	13	13	13	13
96	Alcane	197	13	13	13	13
97	Alcane	197	13	13	13	13
98	Alcane	197	13	13	13	13
99	Alcane	197	13	13	13	13
100	Alcane	197	13	13	13	13
101	Alcane	197	13	13	13	13
102	Alcane	197	13	13	13	13
103	Alcane	197	13	13	13	13
104	Alcane	197	13	13	13	13
105	Alcane	197	13	13	13	13
106	Alcane	197	13	13	13	13
107	Alcane	197	13	13	13	13
108	Alcane	197	13	13	13	13
109	Alcane	197	13	13	13	13
110	Alcane	197	13	13	13	13
111	Alcane	197	13	13	13	13
112	Alcane	197	13	13	13	13
113	Alcane	197	13	13	13	13
114	Alcane	197	13	13	13	13
115	Alcane	197	13	13	13	13
116	Alcane	197	13	13	13	13
117	Alcane	197	13	13	13	13
118	Alcane	197	13	13	13	13
119	Alcane	197	13	13	13	13
120	Alcane	197	13	13	13	13
121	Alcane	197	13	13	13	13
122	Alcane	197	13	13	13	13
123	Alcane	197	13	13	13	13
124	Alcane	197	13	13	13	13
125	Alcane	197	13	13	13	13
126	Alcane	197	13	13	13	13
127	Alcane	197	13	13	13	13
128	Alcane	197	13	13	13	13
129	Alcane	197	13	13	13	13
130	Alcane	197	13	13	13	13
131	Alcane	197	13	13	13	13
132	Alcane	197	13	13	13	13
133	Alcane	197	13	13	13	13
134	Alcane	197	13	13	13	13
135	Alcane	197	13	13	13	13
136	Alcane	197	13	13	13	13
137	Alcane	197	13	13	13	13
138	Alcane	197	13	13	13	13
139	Alcane	197	13	13	13	13
140	Alcane	197	13	13	13	13
141	Alcane	197	13	13	13	13
142	Alcane	197	13	13	13	13
143	Alcane	197	13	13	13	13
144	Alcane	197	13	13	13	13
145	Alcane	197	13	13	13	13
146	Alcane	197	13	13	13	13
147	Alcane	197	13	13	13	13
148	Alcane	197	13	13	13	13
149	Alcane	197	13	13	13	13
150	Alcane	197	13	13	13	13
151	Alcane	197	13	13	13	13
152	Alcane	197	13	13	13	13
153	Alcane	197	13	13	13	13
154	Alcane	197	13	13	13	13
155	Alcane	197	13	13	13	13
156	Alcane	197	13	13	13	13
157	Alcane	197	13	13	13	13
158	Alcane	197	13	13	13	13
159	Alcane	197	13	13	13	13
160	Alcane	197	13	13	13	13
161	Alcane	197	13	13	13	13
162	Alcane	197	13	13	13	13
163	Alcane	197	13	13	13	13
164	Alcane	197	13	13	13	13
165	Alcane	197	13	13	13	13
166	Alcane	197	13	13	13	13
167	Alcane	197	13	13	13	13
168	Alcane	197	13	13	13	13
169	Alcane	197	13	13	13	13
170	Alcane	197	13	13	13	13
171	Alcane	197	13	13	13	13
172	Alcane	197	13	13	13	13
173	Alcane	197	13	13	13	13
174	Alcane	197	13	13	13	13
175	Alcane	197	13	13	13	13
176	Alcane	197	13	13	13	13
177	Alcane	197	13	13	13	13
178	Alcane	197	13	13	13	13
179	Alcane	197	13	13	13	13
180	Alcane	197	13	13	13	13
181	Alcane	197	13	13	13	13
182	Alcane	197	13	13	13	13
183	Alcane	197	13	13	13	13
184	Alcane	197	13	13	13	13
185	Alcane	197	13	13	13	13
186	Alcane	197	13	13	13	13
187	Alcane	197	13	13	13	13
188	Alcane	197	13	13	13	13
189	Alcane	197	13	13	13	13
190	Alcane	197	13	13	13	13
191	Alcane	197	13	13	13	13
192	Alcane	197	13	13	13	13
193	Alcane	197	13	13	13	13
194	Alcane	197	13	13	13	13
195	Alcane	197	13	13	13	13
196	Alcane	197	13	13	13	13
197	Alcane	197	13	13	13	13
198	Alcane	197	13	13	13	13
199	Alcane	197	13	13	13	13
200	Alcane	197	13	13	13	13
201	Alcane	197	13	13	13	13
202	Alcane	197	13	13	13	13
203	Alcane	197	13	13	13	13
204	Alcane	197	13	13	13	13
205	Alcane	197	13	13	13	13
206	Alcane	197	13	13	13	13
207	Alcane	197	13	13	13	13
208	Alcane	197	13	13	13	13
209	Alcane	197	13	13	13	13
210	Alcane	197	13	13	13	13
211	Alcane	197	13	13	13	13
212	Alcane	197	13	13	13	13
213	Alcane	197	13	13	13	13
214	Alcane	197	13	13	13	13
215	Alcane	197	13	13	13	13
216	Alcane	197	13	13	13	13
217	Alcane	197	13	13	13	

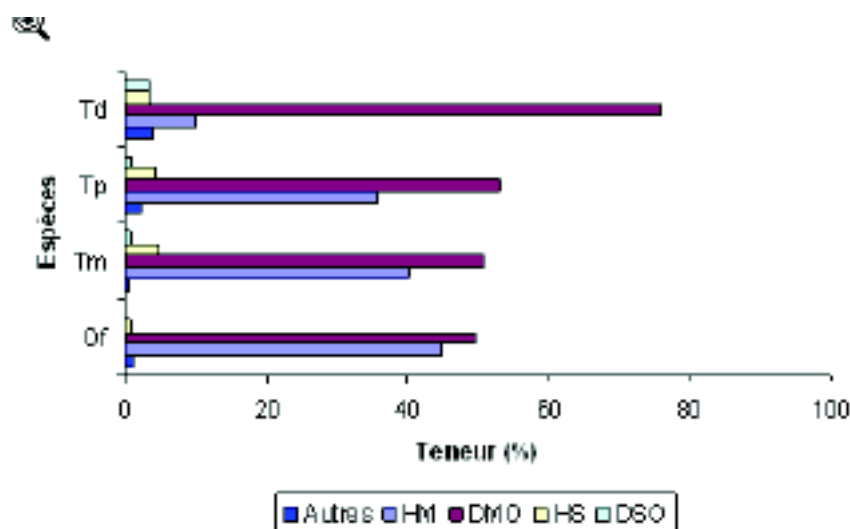


Figure 25 : Pourcentages des classes chimiques constituant chaque HE

L'analyse par CG/SM des HE étudiées a montré que la classe des dérivés monoterpéniques oxygénés (DMO) est la plus importante (49,7 – 76,2 %) suivie par la classe des hydrocarbures monoterpéniques (HM). Cependant, les classes sesquiterpéniques sont les moins représentées (figure 25).

D'une façon générale, toutes les huiles sont caractérisées par la prédominance de quatre composés à savoir le thymol et le carvacrol pour la classe des DMO et le  $p$ -Cymène et le  $\gamma$ -Terpinène pour la classe des HM. Cependant le Linalool et le Géraniol sont les deux composés majoritaires de l'HE de *Thymus dreatensis* en plus du Thymol et de  $\gamma$ -Terpinène (Tableau 35).

Selon Melagan et al., 1995, Ruberto et al., 2002, Belhatab et al., 2004 et Belhatab et al., 2005, la concentration des composés cités précédemment (phénols et hydrocarbures) est complémentaire. Elle est due probablement à la voie biosynthétique commune suivie par ces composés ou bien à la période de récolte et / ou conditions environnementales.

## Evaluation de l'activité antioxydante des HE

### Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH

Les résultats obtenus lors du test de mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) sont résumés dans les tableaux 36 et 37 et les figures 26 et 27.



Concentration (ppm)	Activité de piégeage du radical DPPH <sup>a</sup> (%)						
	BHT	BHA	<i>Tp</i>	<i>Tm</i>	<i>Td</i>	<i>Of</i>	Toc
100	85,5±0,6 <sup>C</sup>	91,4±0,4 <sup>A</sup>	13,4±0,4 <sup>E</sup>	12,3±0,4 <sup>E</sup>	13,4±0,9 <sup>E</sup>	26,8±0,8 <sup>D</sup>	89,5±0,1 <sup>A</sup>
200	86,6±0,6 <sup>B</sup>	91,8±0,7 <sup>A</sup>	29,4±2,0 <sup>D</sup>	21,1±0,4 <sup>E</sup>	23,1±0,8 <sup>E</sup>	42,1±1,5 <sup>C</sup>	91,2±0,4 <sup>A</sup>
400	87,8±0,1 <sup>A</sup>	92,3±0,4 <sup>A</sup>	52,9±6,1 <sup>C</sup>	36,7±0,9 <sup>D</sup>	39,0±0,1 <sup>D</sup>	74,3±0,4 <sup>B</sup>	92,6±0,1 <sup>A</sup>
600	90,4±0,5 <sup>B<sup>C</sup></sup>	93,1±0,4 <sup>AB</sup>	65,3±1,0 <sup>D</sup>	50,6±1,6 <sup>F</sup>	56,7±0,9 <sup>E</sup>	89,7±1,5 <sup>C</sup>	95,1±0,1 <sup>AB</sup>
800	91,3±0,6 <sup>A</sup>	93,2±0,5 <sup>A</sup>	84,3±4,8 <sup>B</sup>	64,8±0,4 <sup>D</sup>	71,4±1,4 <sup>C</sup>	95,6±0,8 <sup>A</sup>	95,7±0,2 <sup>A</sup>
1000	91,8±0,1 <sup>ABC</sup>	93,5±0,1 <sup>AB</sup>	86,9±5,3 <sup>B<sup>C</sup></sup>	79,4±3,0 <sup>D</sup>	86,2±2,8 <sup>CD</sup>	98,8±0,5 <sup>A</sup>	95,8±0,1 <sup>AB</sup>
IC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	<100 <sup>A</sup>	<100 <sup>A</sup>	397,3±27,8 <sup>B</sup>	594,0±5,4 <sup>D</sup>	535,8±10,8 <sup>C</sup>	222,1±7,4 <sup>A</sup>	<100 <sup>A</sup>

Tableau 36: Résultats du test du pouvoir de piégeage du radical DPPH obtenus avec les HE, BHT, BHA et tocophérol

<sup>a</sup> Valeurs exprimées en moyenne ± écart type.

<sup>b</sup> Concentration pour 50 % d'inhibition. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

**BHT** : Butyl hydroxy toluène ; **BHA** : Butyl hydroxy anisol ; ***Tp*** : *Thymus pallescens* ; ***Tm*** : *Thymus munbyanus* ; ***Td*** : *Thymus dreatensis* ; ***Of*** : *Origanum floribundum* ; **Toc** : Tocophérol.

Fractions	Concentration (ppm) <sup>a</sup>						IC <sub>50</sub> <sup>b</sup>
	100	200	400	600	800	1000	
<b>F<sub>1</sub></b>	15,5±3,0 <sup>B</sup>	24,1±2,5 <sup>B</sup>	34,4±0,7 <sup>B</sup>	40,4±1,3 <sup>B</sup>	47,2±2,2 <sup>B</sup>	54,1±0,8 <sup>B</sup>	829,3±28,7 <sup>A</sup>
<b>F<sub>2</sub></b>	51,5±3,4 <sup>A</sup>	72,7±1,1 <sup>A</sup>	73,3±2,3 <sup>A</sup>	73,6±0,9 <sup>A</sup>	73,7±0,7 <sup>A</sup>	74,6±1,7 <sup>A</sup>	<100 <sup>A</sup>

Tableau 37: Résultats du test de DPPH obtenus avec les deux fractions (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>)

<sup>a</sup> Valeurs exprimées en moyenne ± écart type.

<sup>b</sup> Concentration pour 50 % d'inhibition. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

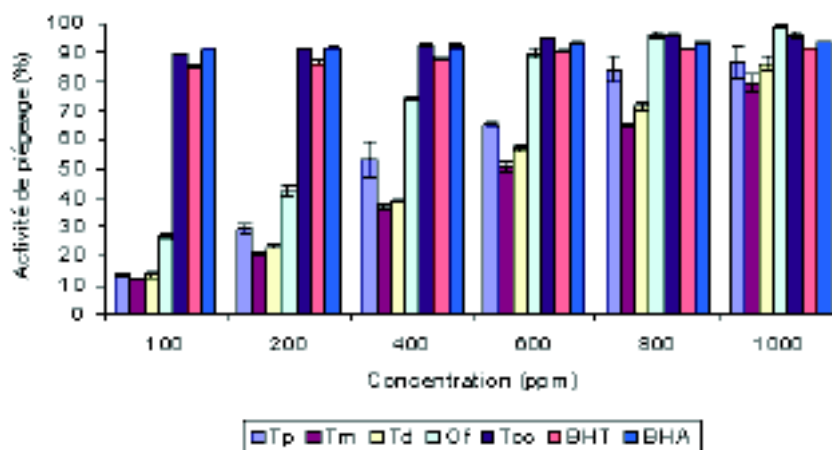


Figure 26: Activité de piégeage du radical DPPH des différentes concentrations des HE étudiées, BHA, BHT et du tocophérol

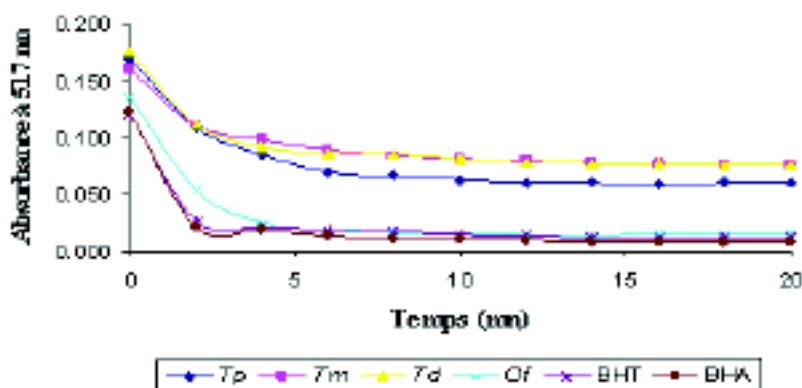


Figure 27: Cinétique de piégeage du radical DPPH par les HE étudiées, BHA, BHT et tocophérol à une concentration de 600 ppm

Le DPPH est usuellement utilisé comme substrat pour évaluer l'activité antioxydante des antioxydants (Oyaizu, 1986). C'est une méthode qui est basée sur la réduction d'une solution méthanolique contenant le DPPH ( $DPPH_{ox}$ ) en présence d'une source donatrice d'hydrogène qui est généralement des antioxydants réduits ( $Aox_{red}$ ) conduisant à la formation de radicaux stables :  $DPPH-H$  ou  $DPPH_{red}$  selon la réaction suivante :

Le pouvoir de piégeage du radical stable DPPH des HE du thym et de l'origan existe puisque ils sont capables de réduire la forme stable de ce radical vers le Diphénylpicrylhydrazine (coloration jaune).

D'une façon générale, l'activité antioxydante des HE étudiées, du BHT, du BHA et de l' $\alpha$ -tocophérol augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration. Les valeurs des  $IC_{50}$  calculées pour les HE étudiées et la  $F_1$ , varient entre 222,1 et 829,3 ppm, néanmoins, ces valeurs restent largement inférieures à celles enregistrées avec les autres échantillons (< 100 ppm).

D'après le tableau 36, une forte activité est significativement observée chez l'HE d'*Origanum floribundum* (222,1 ppm) suivie par la suite par les HE de *Thymus pallescens* et

*Thymus dreatensis* (397,3 et 535,8 ppm respectivement). Tandis que la plus faible capacité à réduire le radical DPPH par les HE testées est significativement signalée chez l'HE de *Thymus munbyanus* (figure 26).

Les antioxydants de synthèse, manifestent une forte activité même à de faibles concentrations. Pour une concentration de 100 ppm, les valeurs enregistrées sont de 85.5, 91.8, 89.5 % respectivement pour le BHT, le BHA et l' $\alpha$ -tocophérol. Les IC<sub>50</sub> de ces derniers n'ont pas été déterminées car la plus faible concentration utilisée pour chaque substance est nettement supérieure à celle nécessaire pour avoir les 50 % d'inhibition.

Pour le cas des deux fractions obtenues avec l'HE de *Thymus pallescens* (tableau 37), deux remarques peuvent être tirées :

Augmentation de l'activité antioxydante des deux fractions en fonction de la concentration ;

Les différentes concentrations de la fraction 2 expriment une bonne activité de piégeage du radical DPPH par rapport à ceux de la fraction 1. Les valeurs des IC<sub>50</sub> calculées pour les deux fractions sont de 829,3 ppm pour la F<sub>1</sub> et inférieure à 100 ppm pour la F<sub>2</sub> cette différence peut être due à la concentration élevée du carvacrol auquel on attribue un rôle prépondérant.

Les résultats obtenus pour l'HE d'origan confirment ceux reportés par **Sari et al ., 2006**, en utilisant le même test pour plusieurs populations d'*Origanum glandulosum* cueillies dans diverses régions d'Algérie.

Pour la cinétique de piégeage du radical DPPH par les HE étudiées, BHA, BHT et  $\alpha$ -tocophérol, deux zones peuvent être distinguées (figure 27):

Zone à forte cinétique de piégeage du radical DPPH avant les 3 premières minutes (diminution rapide de l'absorbance à 517 nm);

Zone à faible cinétique de piégeage du radical DPPH et cela après 3 minutes de mise en contact de ce radical avec les différents antioxydants testés (saturation des sites actifs du radical DPPH).

L'activité de piégeage du radical DPPH peut être expliquée par :

Présence de fortes concentrations en composés phénoliques (thymol et / ou carvacrol). C'est le cas de l'HE d'*Origanum floribundum*, *Thymus pallescens* et de la F<sub>2</sub>.

Présence de composés inconnus (cas de *Thymus dreatensis*).

Par contre le cas de l'HE de *Thymus munbyanus* reste inexplicable car il a manifesté une faible activité réductrice du radical DPPH malgré sa forte teneur en thymol (37,7 %).

Pour cela, et d'après **Koldali et al . (2005)**, la détermination des composés responsables de cette activité serait très difficile.

Cette méthode qui est considérée comme étant très rapide, simple à mettre en œuvre, très sensible, très reproductible et ne nécessitant pas de matériels spécifiques ne peut pas être utilisée seule pour évaluer de manière objective le pouvoir antioxydant de certaines huiles et extraits (**Koleva et al ., 2002**).

---

## Test de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

---

Les résultats du test de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) qui a été appliqué aux quatre huiles essentielles étudiées en plus du BHT, BHA et  $\alpha$ -tocophérol, en présence ou absence d'un initiateur d'oxydation 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP), sont résumés dans les tableaux 38 et 39 et les figures 28 et 29.

Concentration (ppm)	Pourcentage d'activité antioxydante du test TBARS sans ABAP <sup>a</sup>						
	BHT	BHA	Tp	Tm	Td	Of	Toc
100	61,0±3,1 <sup>ab</sup>	52,3±1,7 <sup>bc</sup>	28,8±5,1 <sup>c</sup>	41,8±3,1 <sup>bc</sup>	53,0±6,4 <sup>ab</sup>	50,3±1,1 <sup>bc</sup>	70,3±1,5 <sup>a</sup>
200	63,9±3,7 <sup>ab</sup>	61,5±2,3 <sup>bc</sup>	52,6±2,9 <sup>c</sup>	61,2±1,0 <sup>bc</sup>	61,6±6,4 <sup>ab</sup>	61,5±3,9 <sup>bc</sup>	77,5±1,2 <sup>a</sup>
400	76,7±0,5 <sup>ab</sup>	69,3±2,5 <sup>bc</sup>	62,2±4,0 <sup>c</sup>	78,8±3,3 <sup>ab</sup>	74,8±1,1 <sup>ab</sup>	67,1±2,8 <sup>bc</sup>	82,3±4,2 <sup>a</sup>
600	77,8±5,4 <sup>ab</sup>	75,9±2,0 <sup>bc</sup>	78,2±4,4 <sup>bc</sup>	69,7±1,0 <sup>bc</sup>	82,1±6,0 <sup>ab</sup>	67,7±1,1 <sup>bc</sup>	89,2±2,3 <sup>ab</sup>
800	78,6±5,0 <sup>ab</sup>	81,2±2,2 <sup>bc</sup>	78,8±1,9 <sup>bc</sup>	95,8±1,0 <sup>a</sup>	88,1±6,9 <sup>ab</sup>	78,9±3,9 <sup>bc</sup>	89,4±0,4 <sup>ab</sup>
1000	80,4±3,3 <sup>ab</sup>	83,4±2,0 <sup>bc</sup>	88,5±5,8 <sup>ab</sup>	96,4±1,0 <sup>a</sup>	92,7±1,1 <sup>ab</sup>	81,4±1,9 <sup>bc</sup>	90,2±0,7 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup> Valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  écart type. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

Tableau 38: Activité antioxydante des HE étudiées, BHT, BHA et tocophérol en utilisant le test TBARS sans ABAP

**BHT** : Butyl hydroxy toluène ; **BHA** : Butyl hydroxy anisol ; **Tp** : *Thymus pallescens* ; **Tm** : *Thymus munbyanus* ; **Td** : *Thymus dreatensis* ; **Of** : *Origanum floribundum* ; **Toc** :  $\alpha$ -tocophérol.

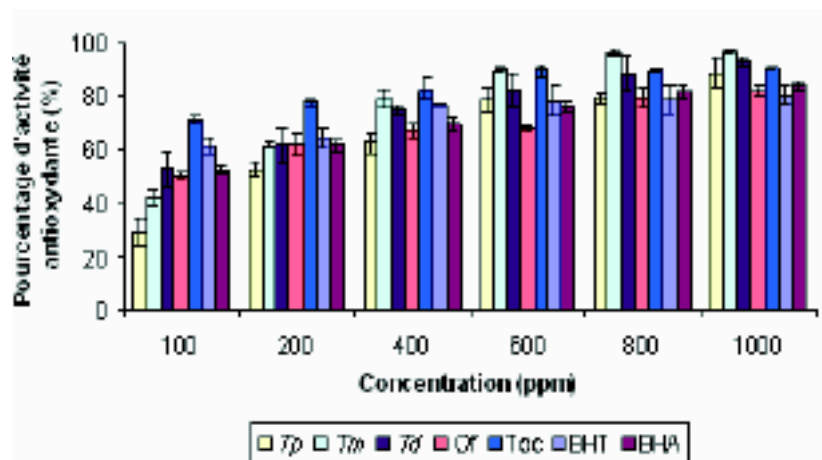


Figure 28 : Activité antioxydante des différentes concentrations des HE étudiées, BHA, BHT et du tocophérol en utilisant le test TBARS sans ABAP

Concentration (ppm)	Pourcentage d'activité antioxydante du test TBARS avec ABAP <sup>a</sup>						
	BHT	BHA	Tp	Tm	Td	Of	Toc
100	42,0±4,9 <sup>a</sup>	62,6±2,1 <sup>bc</sup>	18,8±8,2 <sup>a</sup>	62,5±6,9 <sup>bc</sup>	18,0±1,8 <sup>a</sup>	43,3±4,4 <sup>a</sup>	65,7±4,0 <sup>bc</sup>
200	50,5±3,2 <sup>a</sup>	70,9±5,4 <sup>bc</sup>	45,7±7,6 <sup>ab</sup>	67,4±3,5 <sup>bc</sup>	35,1±1,0 <sup>a</sup>	44,8±8,6 <sup>ab</sup>	83,6±3,4 <sup>d</sup>
400	63,0±2,6 <sup>bc</sup>	80,9±2,4 <sup>d</sup>	63,8±7,0 <sup>bc</sup>	68,2±1,1 <sup>bc</sup>	54,8±2,3 <sup>b</sup>	57,8±6,6 <sup>bc</sup>	88,0±1,4 <sup>d</sup>
600	66,0±6,6 <sup>bc</sup>	86,5±1,2 <sup>d</sup>	66,3±2,9 <sup>bc</sup>	70,1±1,7 <sup>bc</sup>	57,1±0,5 <sup>b</sup>	68,2±1,7 <sup>bc</sup>	88,5±0,9 <sup>d</sup>
800	73,4±4,9 <sup>bc</sup>	87,0±0,8 <sup>de</sup>	72,1±6,0 <sup>bc</sup>	71,6±2,3 <sup>bc</sup>	58,0±1,8 <sup>b</sup>	80,5±2,2 <sup>cd</sup>	90,0±2,1 <sup>d</sup>
1000	74,2±2,7 <sup>bc</sup>	89,5±1,2 <sup>de</sup>	82,6±2,9 <sup>cd</sup>	73,9±8,2 <sup>bc</sup>	80,9±1,5 <sup>b</sup>	85,2±1,7 <sup>cd</sup>	91,3±1,2 <sup>d</sup>

Tableau 39 : Activité antioxydante des HE étudiées, BHT, BHA et tocophérol et utilisant le test TBARS avec ABAP

<sup>a</sup> Valeurs exprimées en moyenne ± écart type. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

**BHT** : Butyl hydroxy toluène ; **BHA** : Butyl hydroxy anisol ; **Tp** : *Thymus pallescens* ; **Tm** : *Thymus munbyanus* ; **Td** : *Thymus dreatensis* ; **Of** : *Origanum floribundum* ; **Toc** : α-tocophérol.

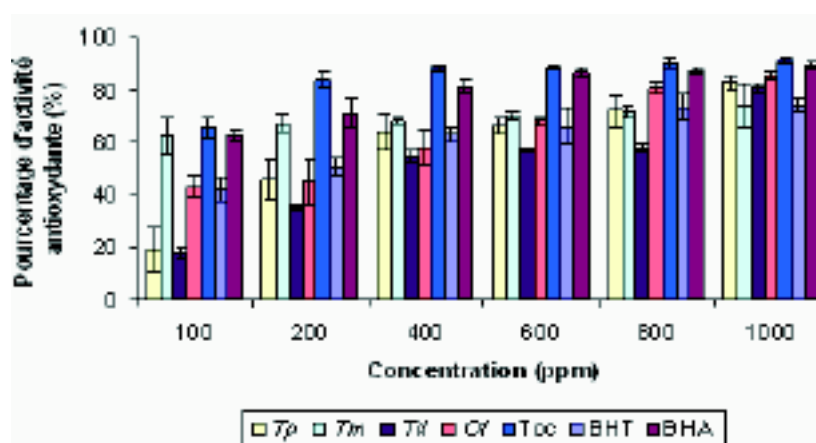


Figure 29 : Activité antioxydante des différentes concentrations des HE étudiées, BHA, BHT et du tocophérol en utilisant le test TBARS avec ABAP

Les figures 28 et 29 illustrent l'activité antioxydante exprimée en pourcentage d'activité de chaque HE étudiée, du BHT, du BHA et de l'α-tocophérol pour des concentrations variant entre 100 et 1000 ppm en milieu riche en lipide (jaune d'œuf) en absence ou en présence d'un inducteur d'oxydation 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP).

Dans le cas où le radical inducteur est absent, la majorité des essences testées et les antioxydants de synthèse manifestent une certaine capacité à limiter la peroxydation lipidique notamment en fortes concentrations.

Pour cela, la meilleure activité est enregistrée avec l'HE de *Thymus munbyanus* (42,8 – 96,4 %) et l'HE de *Thymus dreatensis* (53,0 – 92,7 %). Des activités légèrement inférieures par rapport à celles des *Thymus* précédemment cités peut être notée pour *Thymus pallescens* (28.8-88.5%) et *Origanum floribundum*(50.3-81.4%).

Lorsque l'inducteur ABAP est ajouté au milieu réactionnel, la plupart des échantillons manifestent une diminution de leur activité à l'exception de l'HE d'origan de Chréa, du BHA et de l'α-tocophérol où leur activité est augmentée respectivement à partir de 600, 100 et

200 ppm. Cependant, à de faibles concentrations (100 à 200 ppm), l'ABAP a provoqué une augmentation de l'activité de *Thymus munbyanus*.

L'efficacité relative des HE du thym et de l'origan en absence ou présence de l'ABAP peut être attribuée à la présence de composés phénoliques à savoir le thymol et le carvacrol (**Deighton et al ., 1993**). Mais cette théorie n'explique pas le comportement de certaines HE.

Par exemple, l'HE de *T.munbyanus* qui est un chémotype à thymol (37,4 %) a pu s'opposer à l'oxydation des lipides en absence de l'agent inducteur. Par contre, dès son introduction dans le milieu réactionnel, l'ABAP a provoqué une baisse de plus de 14 % de l'activité de cette HE pour une concentration de 800 ppm.

L'HE de *T. dreatensis*, ayant comme composé majoritaire le linalool, partiellement pauvre en composés phénoliques (thymol et carvacrol) a donné de très bons résultats en absence de l'ABAP (53,0 – 61,6 %) notamment à de très faibles concentrations (100 – 200 ppm).

Dans ce cas de figure, deux hypothèses peuvent être envisagées :

Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HE qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi certains composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système de défense efficace vis-à-vis des attaques des radicaux libres (**Lu et Foo, 2001** et **Singh et al. , 2006**) ;

Dans certaines conditions, beaucoup de composés peuvent interagir avec l'acide thiobarbiturique et accroître ainsi l'absorbance à 532 nm (**Hazzit et al ., 2006**).

**Faleiro et al . (2005)**, rapportent que certains composés peuvent être responsables de la diminution du pouvoir antioxydant de l'HE de *Thymus vulgaris* à de très faibles concentrations. Ces mêmes auteurs confirment également l'augmentation de l'activité antioxydante du BHA et de l'  $\alpha$ -tocophérol en présence de l'ABAP.

**Deans et al . (1998)**, rapportent qu'en absence de l'ABAP, qui est connu d'être capable de produire des radicaux très actifs à 50 °C, l'HE d'*Origanum vulgare*, manifeste une activité antioxydante comparable à celle de l' $\alpha$ -tocophérol en fortes concentrations (750 – 1000 ppm).

Les divers comportements des antioxydants de synthèse et de l' $\alpha$ -tocophérol en absence ou présence de l'agent accélérateur de l'oxydation (ABAP), suggère que le BHA et l' $\alpha$ -tocophérol sont capables d'opérer comme d'excellents antioxydants même si le niveau de radicaux libres est élevé (**Miguel et al ., 2004**).

La structure chimique de certaines molécules ( $\alpha$ -tocophérol, thymol et carvacrol) peut dans certains cas expliquer le comportement des HE et substances pures (**Pryor et al. , 1988**, **Deighton et al. , 1993**).

**Ruberto et al . (2002)** ont utilisé la même méthode pour évaluer l'activité antioxydante des HE d'*Origanum glondulosum* de quatre localités de la région de Sétif et ont conclu que cette activité est en relation directe avec la teneur en composés majoritaires en particulier celle du carvacrol.

La méthode de TBARS est aussi sensible et fournit des résultats reproductibles. Elle est préférable à celle de DPPH parce qu'elle opère dans un environnement similaire à la réalité (**Kulisic et al ., 2004**).

## Mesure du pouvoir réducteur

Les résultats du pouvoir réducteur des huiles essentielles étudiées, du BHT, du BHA, du  $\alpha$ -tocophérol et de l'acide ascorbique, exprimé par l'absorbance à 700 nm, sont résumés dans le tableau 40 et la figure 30.

Echantillons	Absorbance à 700 nm	Concentration <sup>a</sup> (ppm)					
		100	200	400	600	800	1000
BHT		0,77±0,05 <sup>C</sup>	0,82±0,05 <sup>BC</sup>	1,03±0,05 <sup>B</sup>	1,05±0,02 <sup>B</sup>	1,16±0,09 <sup>C</sup>	1,28±0,11 <sup>C</sup>
BHA		2,48±0,05 <sup>B</sup>	2,74±0,02 <sup>A</sup>	2,96±0,03 <sup>A</sup>	3,00±0,03 <sup>A</sup>	3,00±0,02 <sup>A</sup>	3,12±0,06 <sup>A</sup>
<i>Tp</i>		0,39±0,04 <sup>DE</sup>	0,65±0,04 <sup>D</sup>	0,81±0,08 <sup>C</sup>	1,10±0,14 <sup>B</sup>	1,42±0,08 <sup>BC</sup>	1,49±0,10 <sup>C</sup>
<i>Tm</i>		0,41±0,05 <sup>D</sup>	0,65±0,07 <sup>D</sup>	1,05±0,11 <sup>B</sup>	1,27±0,17 <sup>B</sup>	1,54±0,18 <sup>B</sup>	1,76±0,07 <sup>B</sup>
<i>Td</i>		0,24±0,11 <sup>F</sup>	0,42±0,03 <sup>E</sup>	0,56±0,01 <sup>D</sup>	0,60±0,11 <sup>C</sup>	0,88±0,02 <sup>D</sup>	0,93±0,04 <sup>C</sup>
<i>Of</i>		0,39±0,01 <sup>DE</sup>	0,71±0,02 <sup>CD</sup>	0,89±0,14 <sup>BC</sup>	1,01±0,06 <sup>B</sup>	1,15±0,02 <sup>CD</sup>	1,25±0,03 <sup>C</sup>
Toc		0,72±0,02 <sup>C</sup>	0,87±0,06 <sup>B</sup>	0,99±0,01 <sup>BC</sup>	1,05±0,11 <sup>B</sup>	1,19±0,10 <sup>C</sup>	1,32±0,02 <sup>C</sup>
Ac Asc		2,83±0,01 <sup>A</sup>	2,84±0,01 <sup>A</sup>	2,85±0,01 <sup>A</sup>	2,87±0,18 <sup>A</sup>	2,99±0,12 <sup>A</sup>	3,06±0,19 <sup>A</sup>

Tableau 40: Résultats du test du pouvoir réducteur des HE étudiées et de certains antioxydants de synthèses.

<sup>a</sup> Valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  écart type. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

**BHT** : Butyl hydroxy toluène ; **BHA** : Butyl hydroxy anisol ; ***Tp*** : *Thymus pallescens* ; ***Tm*** : *Thymus munbyanus* ; ***Td*** : *Thymus dreatensis* ; ***Of*** : *Origanum floribundum* ; **Toc** :  $\alpha$ -tocophérol ; **Ac Asc**: Acide ascorbique.

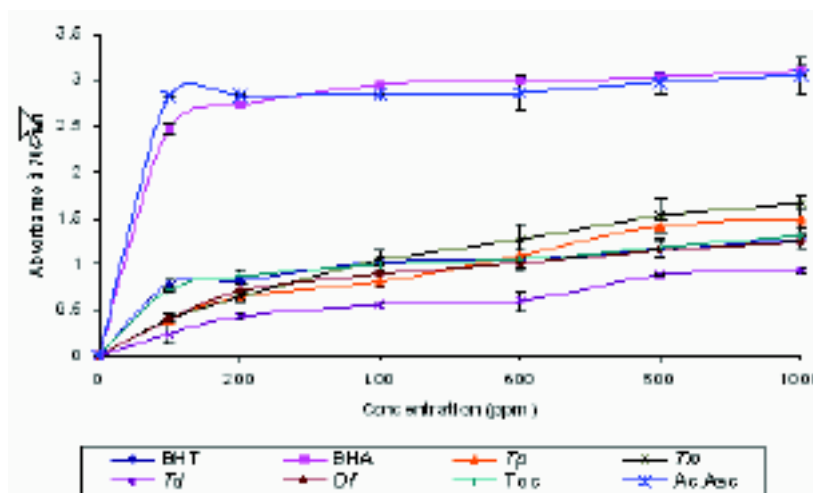


Figure 30: Pouvoir réducteur des HE étudiées, du BHT, du BHA, du tocophérol et de l'acide ascorbique (100 à 1000 ppm)

Selon (Tanaka et al., 1988, Pin-Der-Duh, 1998), l'expression de l'activité antioxydante va de soit avec le développement de groupements *réductones*. Ces derniers sont connus d'être des *terminators* vis-à-vis des réactions en chaînes des radicaux libres (Pin-Der-Duh, 1998).

Ces composés sont capables de réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ), céder des électrons et transformer les radicaux libres actifs en des produits stables (Dorman et al., 2004, Singh et al., 2006). Les réductones sont aussi connus pour leur réaction avec certains précurseurs de peroxydes (Kumaran et Karunakaran, 2006).

Le pouvoir réducteur des HE du thym et de l'origan et celui du BHT, BHA et  $\alpha$ -tocophérol, comparé à celui d'un composé de référence (acide ascorbique) augmente en fonction de leurs concentrations (Figure 30).

La valeur maximale est significativement enregistrée chez le BHA (3,12) où son activité a légèrement dépassé celle de l'acide ascorbique (3,06) et la plus faible valeur est signalée chez *Thymus dreatensis* (0,93).

Pour les trois autres HE étudiées, une bonne activité est enregistrée chez *T. munbyanus* (1,76) où il a largement dépassé celle du BHT et de l' $\alpha$ -tocophérol suivi par la suite par *T. pallescens*. Selon Shimada et al. (1992), ce pouvoir réducteur peut être expliqué par une réaction de substitution de groupements Mono et Dihydroxyles à l'intérieur du noyau aromatique qui possède une bonne habilité donatrice de groupement hydrogènes.

Diplock en 1997, explique le pouvoir réducteur des antioxydants par divers mécanismes à savoir :

prévention de l'initiation des réactions d'oxydations en chaînes ;

blocage des catalyseurs métalliques ;

décompositions des peroxydes ;

prévention contre toute abstraction continue d'hydrogène, capacité réductrice et piégeage de radicaux.

## Mesure du pouvoir de piégeage du radical hydroxyle ( $\text{OH}^-$ )

Les résultats obtenus lors du test de mesure du pouvoir de piégeage du radical hydroxyle ( $\text{OH}^-$ ) sont résumés dans le tableau 41 et la figure 31.

Concentration (ppm)	Activité de piégeage du radical OH (%) <sup>a</sup>					
	BHT	<i>Tp</i>	<i>Tm</i>	<i>Td</i>	<i>Op</i>	Toc
100	27,6±3,7 <sup>ab</sup>	33,0±3,7 <sup>bc</sup>	54,9±1,4 <sup>d</sup>	17,6±1,9 <sup>e</sup>	38,9±3,3 <sup>cd</sup>	23,5±2,3 <sup>ab</sup>
200	34,9±1,9 <sup>b</sup>	40,4±3,9 <sup>c</sup>	57,4±0,9 <sup>d</sup>	23,8±3,9 <sup>ef</sup>	49,4±3,0 <sup>cd</sup>	42,6±3,3 <sup>bc</sup>
400	38,0±3,3 <sup>bc</sup>	45,7±3,7 <sup>cd</sup>	59,0±1,4 <sup>d</sup>	24,7±1,9 <sup>e</sup>	51,5±1,9 <sup>d</sup>	44,4±0,9 <sup>cd</sup>
600	44,1±1,4 <sup>c</sup>	54,0±1,9 <sup>d</sup>	60,2±1,9 <sup>d</sup>	29,0±1,9 <sup>ef</sup>	54,9±1,9 <sup>cd</sup>	47,8±2,3 <sup>cd</sup>

Tableau 41: Résultats du test du pouvoir de piégeage du radical hydroxyle  $\text{OH}^-$

<sup>a</sup> Valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  écart type. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).



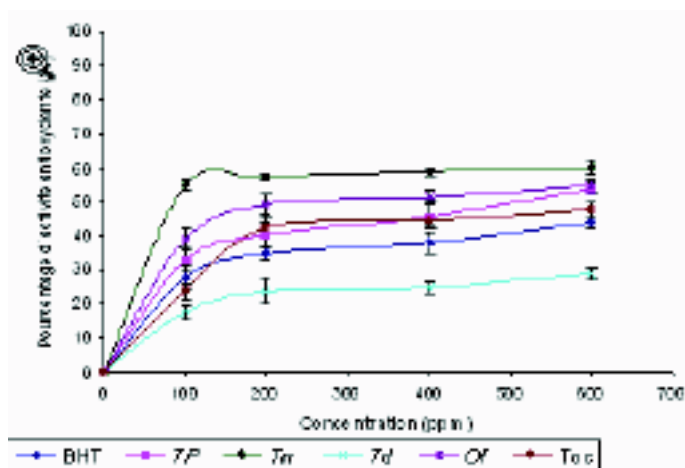


Figure 31 : Activité de piégeage du radical Hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) des différentes concentrations des HE étudiées, BHT et du tocophérol

Dans ce test, les radicaux hydroxyls générés par le système réactionnel ( $\text{EDTA}/\text{FeCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{acide ascorbique}$ ) sont capables d'attaquer le désoxyribose et de donner une coloration violette en présence du TBA en milieu chaud et acide (Halliwell et al., 1987, Aruoma et al., 1989, Mimica-Dukic et al., 2004).

Lorsque les HE ou certaines substances sont incubées avec le mélange réactionnel, elles sont capables d'interférer avec la réaction des radicaux libres et protégeraient ainsi le sucre (désoxyribose) contre d'éventuelles dégradations (Burits et al., 2001).

Durant ce test, les concentrations employées pour chaque HE, BHT et  $\alpha$ -tocophérol ne dépassent pas les 600 ppm (tableau 41) et cela par manque du substrat (sucre). Les résultats illustrés par la figure 31 montrent que l'activité de piégeage du radical  $\text{OH}^\bullet$  augmente en fonction de la concentration (même constat durant les tests précédents).

Une meilleure activité est significativement enregistrée chez l'HE de *Thymus munbyanus* qui reste actif même à de très faibles concentrations (54,9 % pour 100 ppm) suivi ensuite par les HE d'*Origanum floribundum* et de *Thymus pallescens*. Ces derniers dépassent largement les valeurs enregistrées avec le BHT et l' $\alpha$ -tocophérol. Cependant, l'HE de *Thymus dreatensis* n'a pas pu assurer une bonne protection du sucre (29 % à 600 ppm).

Il a été démontré que certains composés des HE (Alcanales et certains aldéhydes aliphatiques) réagissent avec le TBA pour donner des composés colorés qui se traduit par une augmentation de l'absorbance à 532 nm (Burits et al., 2001).

Les composés phénoliques présents dans ces HE constituent une bonne source donatrice d'électrons ce qui accélère la conversion de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  (Ruch et al., 1984).

Singh et al. (2006), en testant le pouvoir de piégeage du radical  $\text{OH}^\bullet$  de certains composés phénoliques (Thymol et carvacrol) concluent que ces derniers sont capables de former des complexes avec les ions  $\text{Fe}^{3+}$  dans le mélange réactionnel. Cette théorie peut vraisemblablement expliquer le cas des HE de *T. munbyanus*, de *T. pallescens* et de l'origan de Chréa.

Pour **Dorman et al ., (2004)**, ils expliquent ce phénomène par l'aptitude de certains extraits ou HE à inhiber la formation des TBARS à pH 7,4 par le piégeage des radicaux hydroxyles avant même leur réaction avec le désoxyribose.

## Indice de peroxyde (IP)

Les hydroperoxydes font partie des premiers produits formés au cours des réactions d'oxydation. Ce sont des molécules instables rapidement décomposées en produits secondaires de type aldéhydes, cétones, alcools...

Les résultats de l'indice de peroxyde (IP) obtenus au cours des 88 jours de conservation dans les conditions citées précédemment sont résumés dans le tableau 42. La figure 32 illustre l'évolution de l'IP des échantillons ayant fourni les plus faibles valeurs par rapport au témoin.

		Indice de peroxyde * (Meq d'O <sub>2</sub> /Kg)					
Echantillons / Temps (jours)		0	15	36	52	68	88
<b>1</b>	<b>Témoin</b>	<b>1,9±0,1</b>	<b>28,3±1,1</b>	<b>67,8±1,8</b>	<b>117,0±2,1</b>	<b>146,3±2,1</b>	<b>185,0±2,8</b>
2	H T + 100 ppm 7p	1,9±0,1	27,8±0,4	68,3±2,1	112,6±4,8	141,8±1,4	189,3±1,8 <sup>C</sup>
3	H T + 200 ppm 7p	1,9±0,1	26,3±5,3	63,3±3,9	114,3±2,5	147,5±1,1	190,4±0,9 <sup>BC</sup>
4	H T + 400 ppm 7p	1,9±0,1	26,3±1,8	68,5±2,1	108,1±5,8	146,5±1,8	189,6±0,5 <sup>B</sup>
5	H T + 600 ppm 7p	1,9±0,1	22,5±3,5	66,8±0,7	111,8±0,4	146,5±1,1	192,5±0,7 <sup>B</sup>
6	H T + 800 ppm 7p	1,9±0,1	25,3±0,4	60,6±4,1	106,8±4,6	148,8±2,1	189,3±2,5 <sup>B</sup>
<b>7</b>	<b>H.T.+ 1000 ppm 7p</b>	<b>1,9±0,1</b>	<b>30,0±3,5</b>	<b>56,9±4,1</b>	<b>104,3±2,5</b>	<b>143,5±0,4</b>	<b>185,9±0,2<sup>C</sup></b>
8	H T + 100 ppm 7d	1,9±0,1	28,8±5,3	79,8±0,4	119,3±0,4	155,0±3,2	193,8±0,4 <sup>B</sup>
9	H T + 200 ppm 7d	1,9±0,1	25,0±3,5	75,1±0,5	113,1±0,2	157,8±4,9	193,1±1,6 <sup>B</sup>
<b>10</b>	<b>H.T.+ 400 ppm 7d</b>	<b>1,9±0,1</b>	<b>22,6±0,1</b>	<b>75,5±0,7</b>	<b>99,6±0,5</b>	<b>140,8±0,4</b>	<b>185,0±2,1<sup>BC</sup></b>
11	H T + 600 ppm 7d	1,9±0,1	27,5±3,5	71,3±1,8	104,1±7,2	153,5±1,1	193,0±0,7 <sup>B</sup>
12	H T + 800 ppm 7d	1,9±0,1	37,8±0,4	77,8±1,8	113,4±1,2	158,5±1,1	191,8±0,4 <sup>B</sup>
13	H T + 1000 ppm 7d	1,9±0,1	31,3±5,3	82,8±3,9	108,3±5,7	151,3±4,9	190,9±0,5 <sup>B</sup>
14	H T + 100 ppm 7m	1,9±0,1	32,5±3,5	67,5±0,7	109,8±6,7	154,8±0,7	188,3±1,1 <sup>C</sup>
15	H T + 200 ppm 7m	1,9±0,1	30,0±3,5	69,5±2,1	104,8±1,8	151,0±0,4	184,0±1,4 <sup>B</sup>
16	H T + 400 ppm 7m	1,9±0,1	22,6±0,1	55,4±1,6	93,3±1,8	150,3±1,4	183,9±1,2 <sup>C</sup>
17	H T + 600 ppm 7m	1,9±0,1	23,8±1,8	62,3±3,2	97,3±3,9	143,0±1,8	188,5±0,7 <sup>C</sup>
18	H T + 800 ppm 7m	1,9±0,1	23,8±1,8	61,9±0,5	98,0±3,5	140,3±4,9	187,8±1,1 <sup>B</sup>
<b>19</b>	<b>H.T.+ 1000 ppm 7m</b>	<b>1,9±0,1</b>	<b>22,8±0,4</b>	<b>64,8±1,8</b>	<b>101,3±3,9</b>	<b>152,3±7,8</b>	<b>182,3±1,8<sup>C</sup></b>
20	H T + 100 ppm 7c	1,9±0,1	32,4±0,1	77,8±4,9	123,3±0,4	170,3±7,1	207,0±1,4 <sup>A</sup>
21	H T + 200 ppm 7c	1,9±0,1	30,0±7,1	79,0±1,4	116,1±0,9	168,3±0,7	203,5±0,7 <sup>A</sup>
22	H T + 400 ppm 7c	1,9±0,1	31,3±5,3	78,3±2,5	113,4±0,5	155,8±4,9	204,0±0,7 <sup>A</sup>
23	H T + 600 ppm 7c	1,9±0,1	28,8±1,8	85,5±2,8	112,3±1,1	151,0±6,0	198,5±0,7 <sup>A</sup>
24	H T + 800 ppm 7c	1,9±0,1	25,5±0,7	87,8±3,5	114,3±1,1	154,8±6,9	197,9±0,2 <sup>A</sup>
<b>25</b>	<b>H.T.+ 1000 ppm 7c</b>	<b>1,9±0,1</b>	<b>27,5±3,5</b>	<b>78,5±5,7</b>	<b>108,8±5,3</b>	<b>136,5±1,8</b>	<b>195,8±1,1<sup>A</sup></b>
26	H T + 100 ppm BHT	1,9±0,1	20,8±1,1	55,4±0,2	72,0±5,7	108,5±6,0	140,5±0,7 <sup>B</sup>
27	H T + 200 ppm BHT	1,9±0,1	16,3±1,8	52,5±3,5	63,8±0,4	84,0±0,4	119,5±1,4 <sup>B</sup>
28	H T + 400 ppm BHT	1,9±0,1	16,3±5,3	43,1±2,7	54,0±0,7	72,5±2,5	99,5±1,4 <sup>D</sup>
29	H T + 600 ppm BHT	1,9±0,1	17,5±3,5	41,1±0,9	52,8±1,1	74,5±2,5	101,3±1,1 <sup>C</sup>
30	H T + 800 ppm BHT	1,9±0,1	17,5±3,5	41,1±4,1	48,8±2,1	68,3±1,4	90,0±1,4 <sup>C</sup>
<b>31</b>	<b>H.T.+ 1000 ppm BHT</b>	<b>1,9±0,1</b>	<b>21,3±1,8</b>	<b>40,8±3,9</b>	<b>44,1±0,9</b>	<b>67,8±0,7</b>	<b>80,8±1,1<sup>D</sup></b>
<b>32</b>	<b>H.T.+ 100 ppm BHA</b>	<b>1,9±0,1</b>	<b>16,3±1,8</b>	<b>68,8±0,4</b>	<b>91,8±5,3</b>	<b>137,5±0,4</b>	<b>182,5±0,7<sup>D</sup></b>
33	H T + 200 ppm BHA	1,9±0,1	16,3±1,8	69,6±3,0	98,4±0,5	145,3±4,9	185,9±0,5 <sup>BC</sup>
34	H T + 400 ppm BHA	1,9±0,1	18,8±1,8	70,8±0,4	100,8±1,1	139,0±3,2	186,1±1,6 <sup>BC</sup>
35	H T + 600 ppm BHA	1,9±0,1	21,3±1,8	69,9±2,7	103,1±0,2	140,8±5,1	191,3±0,7 <sup>BC</sup>
36	H T + 800 ppm BHA	1,9±0,1	20,0±3,5	59,3±0,4	96,5±3,5	132,0±1,1	187,8±1,1 <sup>B</sup>
37	H T + 1000 ppm BHA	1,9±0,1	21,3±1,8	67,6±1,6	104,4±0,2	139,8±7,8	193,5±0,7 <sup>AB</sup>

Tableau 42: Evolution de l'IP (Meq d'O<sub>2</sub>/Kg d'huile) des différents échantillons en fonction du temps de stockage

<sup>a</sup> Valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  écart type. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

**H.T.** : huile de tournesol, **BHT** : Butyl hydroxy toluène ; **BHA** : Butyl hydroxy anisol ; **T.p** : *Thymus pallescens* ; **T.m** : *Thymus munbyanus* ; **T.d** : *Thymus dreatensis* ; **O.f** : *Origanum floribundum*.

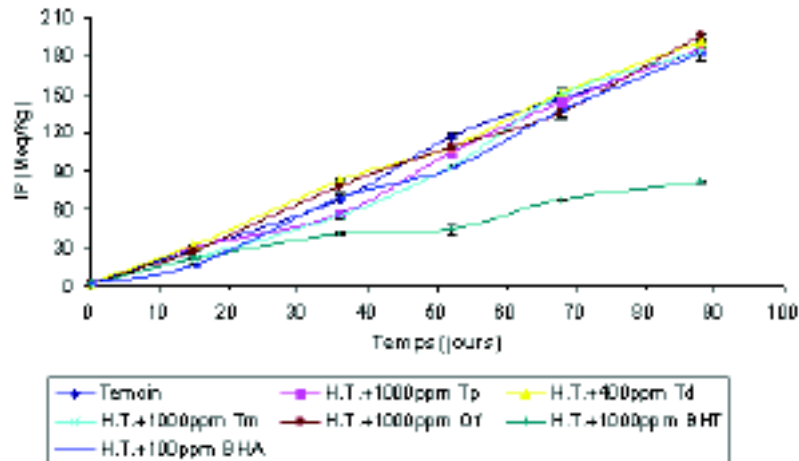


Figure 32 : Evolution de l'indice de peroxyde de l'huile de tournesol des échantillons ayant fourni les plus faibles indices par rapport au témoin au cours du stockage

La détermination de l'indice de peroxyde est une méthode normalisée (AFNOR, AOCS, UICPA). Elle présente un critère très utile et très sensible pour apprécier les premiers stades de la détérioration oxydative des lipides. Cependant un résultat faible ne précise pas si le corps gras est de bonne qualité ou s'il est déjà complètement oxydé, mais il convient de s'assurer de la qualité de la matrice initiale (Rolland, 2004).

La vitesse de formation des hydroperoxydes augmente rapidement au niveau de tous les échantillons après une période d'incubation de 15 jours (Tableau 42). Comparés aux valeurs enregistrées avec le témoin, tous les antioxydants naturels employés en plus du BHA n'ont pas pu ralentir l'apparition des hydroperoxydes exception faite avec les échantillons : 7, 10, 19, 25, 31 et 32 (figure 32).

Les résultats obtenus montrent que l'HE d'*Origanum floribundum* a manifesté un effet prooxydant puisque dans la majorité des mesures de l'indice de peroxyde, les valeurs trouvées sont largement supérieures à celle du témoin où la valeur maximale de l'IP est signalée chez l'échantillon n° 25 (figure 32). Le cas du témoin peut être expliqué par deux phénomènes à savoir :

Protection de l'huile contre toute oxydation poussée par l' $\alpha$ -tocophérol naturellement présent dans ce corps gras d'origine végétal ;

Conversion des hydroperoxydes formés au cours des premiers stades de l'oxydation en composés plus stables : aldéhydes, cétones... (Gray, 1978, Warner et Eskin, 1995, Eymard, 2003).

En revanche, une meilleure activité antioxydante est enregistrée avec le BHT pour une concentration de 1000 ppm (80,8 meq d' $O_2$ /Kg).

Selon **Anwar et al . (2000)** et **Ikbal et Bhanger (2007)**, les composés phénoliques peuvent se combiner avec les hydroperoxydes pour donner des composés plus stables facilement dégradables au cours du temps.

Les résultats obtenus durant ce test ne permettent pas d'estimer l'efficacité antioxydante des HE et des antioxydants de synthèse employés puisque plusieurs composés de ces HE et de l'huile de tournesol peuvent interagir entre eux produisant ainsi des effets synergiques ou antagonistes non mesurables (**Miguel et al ., 2004**).

L'indice de peroxyde est conventionnellement employé pour évaluer les détériorations oxydatives des huiles, graisses et autre aliments riches en lipides (**Gertz et al ., 2000**). Le pouvoir d'un antioxydant peut être estimé par quantification des produits primaires ou secondaires issus de l'oxydation (**Chen et Ahn, 1998**).

### Mesures des diènes conjugués

Les diènes conjugués, produits primaires de l'oxydation des lipides, se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoylé résultant du départ d'un hydrogène sur un acide gras possédant au moins deux doubles liaisons en position 1,4-pentadiène (**Eymard, 2003**).

La mesure a été réalisée à la fin de la période de stockage (88 jours). Elle a concerné uniquement les échantillons qui ont fourni les plus faibles indices de peroxydes (7, 10, 19, 25, 31, 32), du témoin (1) et de l'échantillon ayant la valeur de IP la plus élevée (20). Les valeurs des diènes conjugués obtenus (absorbance à 232 nm) sont résumées dans le tableau 43.

Tableau 43: Mesure des diènes conjugués (A<sub>232</sub>)

N°	Echantillons	Diènes conjugués (A <sub>232</sub> )
1	Témoin	2,443 ± 0,286 <sup>B</sup>
7	H.T.+ 1000 ppm <i>Thymus pallescens</i>	2,137 ± 0,053 <sup>B</sup>
10	H.T.+ 400 ppm <i>Thymus dreatensis</i>	2,370 ± 0,088 <sup>B</sup>
19	H.T.+ 1000 ppm <i>Thymus munbyanus</i>	2,016 ± 0,279 <sup>B</sup>
20	H.T.+ 100 ppm <i>Origanum floribundum</i>	2,285 ± 0,236 <sup>B</sup>
25	H.T.+ 1000 ppm <i>Origanum floribundum</i>	2,183 ± 0,164 <sup>B</sup>
31	H.T.+ 1000 ppm BHT	0,959 ± 0,136 <sup>A</sup>
32	H.T.+ 100 ppm BHA	2,064 ± 0,099 <sup>B</sup>

<sup>a</sup> Valeurs exprimées en moyenne ± écart type. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05). H.T. : huile de tournesol.

Les valeurs des diènes conjugués obtenus confirment les résultats trouvés lors du test de l'indice de peroxyde notamment pour l'antioxydant de synthèse (BHT). Ce dernier a enregistré d'une façon significative la plus faible valeur d'absorbance à 232 nm (0,959) suivie par suite par l'HE de *T. munbyanus* pour une concentration de 1000 ppm (2,016).

En revanche, le témoin a révélé la plus grande valeur par rapport aux autres échantillons (2,443) ceci peut être expliqué par l'absence d'antioxydants permettant d'assurer une protection de cette huile contre l'oxydation.

Les valeurs élevées des diènes conjugués enregistrées peuvent être reliées à la forte concentration des acides gras polyinsaturés contenus dans l'huile de tournesol (**Liu et White, 1992** et **Ikbal et Bhangar, 2007**).

Enfin, cette méthode est très facile à mettre en œuvre mais elle présente l'inconvénient d'être moins sensible et de ne pas être liée à des valeurs de références, donc difficile d'interprétation dans l'absolu. Cependant, ce type de suivi présente un intérêt dans le cadre d'un contrôle de qualité pour une source de corps gras donnée (**Judde, 2004**).

## Dosage des acides gras par chromatographie phase gazeuse

L'analyse par CPG des esters méthyliques d'acides gras de l'huile de tournesol a révélé la présence de 6 acides gras avec une prédominance de l'acide linoléique (C<sub>18</sub> : 2) avec une teneur de 61,78 % (Tableau 44).

Acides gras <sup>o</sup>	Teneur (%) <sup>o</sup>
C <sub>14</sub> :0 <sup>o</sup>	0,06 <sup>o</sup>
C <sub>16</sub> :0 <sup>o</sup>	8,22 <sup>o</sup>
C <sub>18</sub> :0 <sup>o</sup>	3,88 <sup>o</sup>
Total AGS <sup>o</sup>	12,16 <sup>o</sup>
C <sub>18</sub> :1 <sup>o</sup>	23,90 <sup>o</sup>
C <sub>18</sub> :2 <sup>o</sup>	61,78 <sup>o</sup>
C <sub>18</sub> :3 <sup>o</sup>	2,55 <sup>o</sup>
Total AGI <sup>o</sup>	87,84 <sup>o</sup>

Tableau 44: Composition en acides gras de l'huile de tournesol

A la fin de la période de stockage, la teneur en acides gras des mêmes échantillons concernés par la mesure des diènes conjugués ont été déterminés selon les conditions opératoires citées précédemment.

La variation des proportions d'acides gras polyinsaturés est, dans certains cas, un marqueur de l'oxydation des lipides (**Gray et Monahan, 1992**, **Ikbal et Bhangar, 2007**). Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne sont oxydés prioritairement et leur proportion diminue au cours de l'avancement des réactions d'oxydation (**Eymard, 2003**).

Mais compte tenu des faibles quantités des produits d'oxydation formés (de l'ordre de ppb ou ppm pour les composés volatils, de l'ordre des ppm ou 0,1 % pour les hydroperoxydes), cette méthode serait moins sensible pour déceler la fine variation de la composition des acides gras en fonction du temps de stockage (**Judde, 2004**). Le suivi a concerné donc uniquement l'acide linoléique puisque c'est l'acide gras polyinsaturé le plus important dans le cas de l'huile de tournesol. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 45.

Echantillons	Teneur en acide linoléique (%)	
	Avant stockage	Après stockage
Témoin	61,78	59,85
H.T. + 1000 ppm <i>Thymus pallescens</i>	61,78	59,60
H.T. + 400 ppm <i>Thymus dreatensis</i>	61,78	59,52
H.T. + 1000 ppm <i>Thymus munbyanus</i>	61,78	60,01
H.T. + 100 ppm <i>Origanum floribundum</i>	61,78	59,25
H.T. + 1000 ppm <i>Origanum floribundum</i>	61,78	59,49
H.T. + 1000 ppm BHT	61,78	<b>60,31</b>
H.T. + 100 ppm BHA	61,78	59,83

Tableau 45: Evolution de la teneur en acide linoléique avant et après stockage

Les résultats obtenus confirment une seconde fois ceux obtenus lors des deux tests précédents. Une nette diminution de la teneur en acide linoléique est observée chez tous les échantillons analysés.

Une bonne protection vis-à-vis de l'oxydation de cet acide est enregistrée une fois de plus avec le BHT et avec l'HE de *Thymus munbyanus* pour une concentration de 1000 ppm. Par contre une très forte perte est signalée avec l'HE d'*Origanum floribundum* pour une concentration de 100 ppm (59,25 %).

## Conclusion

L'utilisation de plusieurs méthodes pour évaluer l'activité antioxydante est nécessaire (Frankel et al., 1994, Koleva et al., 2002) puisque la majorité des résultats obtenus lors des différents tests employés varient en fonction de la méthode utilisée.

En conclusion, le pouvoir antioxydant des huiles essentielles testées et celui du BHT, BHA et l' $\alpha$ -tocophérol dépend essentiellement de la méthode utilisée, de la concentration, de la nature et les propriétés physicochimiques des substances antioxydantes employées (Koleva et al., 2002).

## Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE

La méthode des aromatogrammes est la technique choisie pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE étudiées. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide. Pour cela, sept (07) souches microbiennes ont été testées. Ces dernières proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie du **CRD-SAIDAL**.

L'activité antimicrobienne des HE est évaluée en fonction du diamètre (mm ou cm) des zones d'inhibition de la croissance microbienne (Deans et Ritchie, 1987, Sivropoulou et al., 1996, Smith-Palmer et al., 1998, Dorman et Deans, 2000, Lis-Balchin et al., 2000, Faleiro et al., 2003, Kunle et al., 2003).

L'estimation de l'activité antimicrobienne des HE est basée sur une échelle de mesure mise en place par **Meena et Sethi (1994)** et **Ela et al ., (1996)**. Ils ont classé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 04 classes :

Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28 mm ;

Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 16 et 28 mm ;

Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 10 et 16 mm ;

Non inhibitrice lorsque le diamètre d'inhibition est inférieur à 10 mm.

## Bactéries Gram négatif

Les résultats de l'activité antimicrobienne des HE testées vis-à-vis des bactéries Gram négatif exprimés par la mesure des diamètres d'inhibitions, sont rapportés dans le tableau 46 et la figure 33.

Tableau 46: Diamètres des zones d'inhibition<sup>a</sup> (en mm) dans le cas des bactéries Gram

Souches	<i>Thymus pallescens</i>	<i>Thymus dreatensis</i>	<i>Thymus munbyanus</i>	<i>Origanum floribundum</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34,00± 1,00 <sup>D</sup>	17,67 ± 0,58 <sup>D</sup>	27,00 ± 1,00 <sup>EF</sup>	33,00 ± 1,00 <sup>B</sup>
<i>Escherichia coli</i>	30,33 ± 0,58 <sup>E</sup>	21,00 ± 1,00 <sup>C</sup>	28,67 ± 1,15 <sup>D</sup>	23,00 ± 1,00 <sup>D</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40,33 ± 0,58 <sup>B</sup>	23,33 ± 1,53 <sup>C</sup>	38,67 ± 1,15 <sup>B</sup>	32,00 ± 1,00 <sup>B</sup>

a Valeurs exprimées en moyenne ± écart type. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

Selon l'échelle citée par **Meena et Sethi (1994)** et **Ela et al ., (1996)** :

L'HE du *Thymus pallescens* a une forte action inhibitrice sur les trois bactéries Gram<sup>-</sup> étudiées ;

L'HE du *Thymus dreatensis* a une action modérément inhibitrice sur les trois bactéries Gram<sup>-</sup> étudiées ;

L'HE du *Thymus munbyanus* a une action modérément inhibitrice sur *Pseudomonas aeruginosa* et une forte action inhibitrice sur *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* ;

L'*Origanum floribundum* a une forte action inhibitrice sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, et une action modérément inhibitrice sur *Escherichia coli*.

*Klebsiella pneumoniae* est avérée la souche la plus sensible à l'action des HE des trois espèces du thym, par contre *Escherichia coli* est la bactérie la plus résistante à l'action de l'HE de l'*Origanum floribundum*.

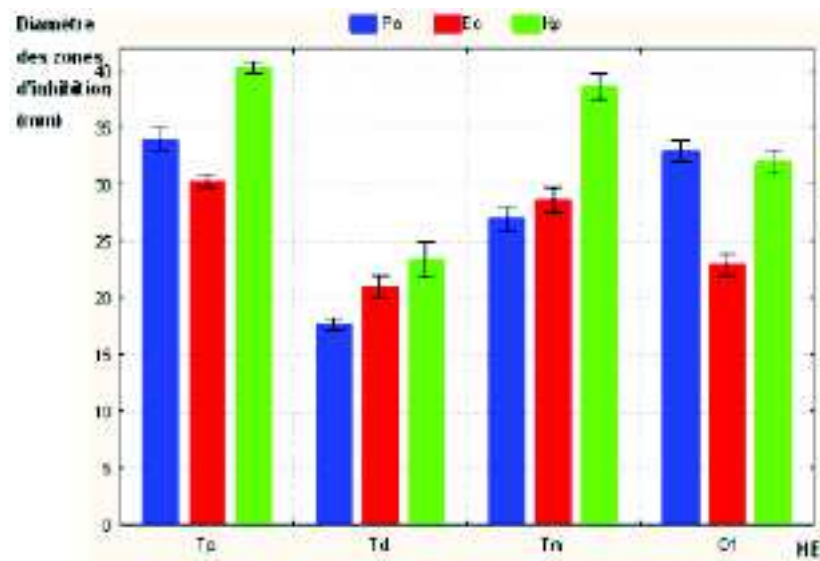


Figure 33 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des bactéries Gram- en fonction des HE étudiées

Tp : *Thymus pallescens* ; Pa : *Pseudomonas aeruginosa* ;

Td : *Thymus dreatensis* ; Ec : *Escherichia coli* ;

Tm : *Thymus munbyanus*; Kp : *Klebsiella pneumoniae*.

Of : *Origanum floribundum*.

Les figures 34, 35 et 36 montrent les photographies des résultats obtenus sur boîtes de Pétri de l'activité antimicrobienne des HE testées sur les bactéries Gram<sup>-</sup>, après 24 h d'incubation.

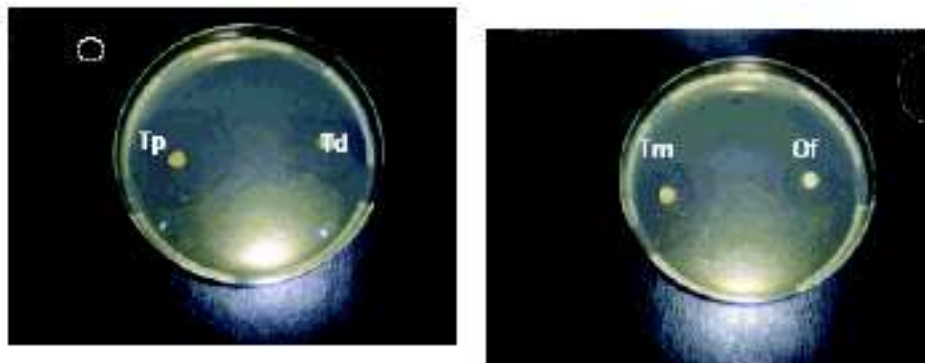
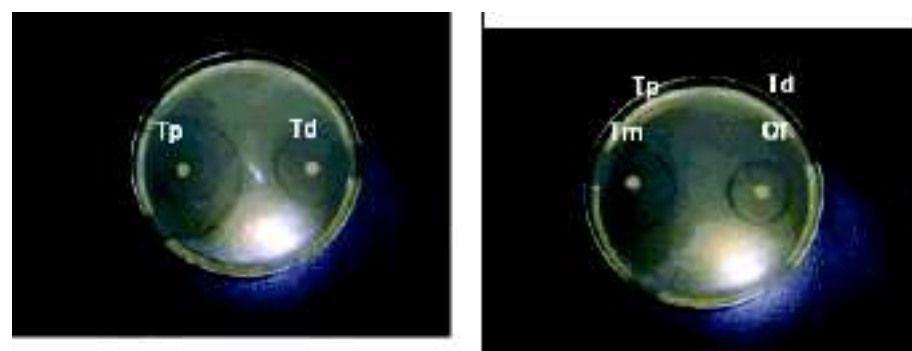


Figure 34: Zones d'inhibition des HE testées sur *Pseudomonas aeruginosa*

**Tp** : *Thymus pallescens* ; **Td** : *Thymus dreatensis* **Tm**: *Thymus munbyanus*; **Of**: *Origanum floribundum*



Figure 35: Zones d'inhibition des HE testées sur *Escherichia coli*Figure 36: Zones d'inhibition des HE testées sur *Klebsiella pneumoniae*

## Bactéries Gram positif

Le tableau 47 et la figure 37 regroupent les résultats obtenus de l'activité inhibitrice des HE des quatre espèces étudiées sur les bactéries Gram<sup>+</sup>.

Tableau 47: Diamètres des zones d'inhibition<sup>a</sup> (en mm) dans le cas des bactéries Gram<sup>+</sup>

Souches	<i>Thymus pallescens</i>	<i>Thymus dreatensis</i>	<i>Thymus munbyanus</i>	<i>Origanum floribundum</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	49,67 ± 0,58 <sup>A</sup>	33,00 ± 1,00 <sup>A</sup>	43,67 ± 0,58 <sup>A</sup>	42,33 ± 1,53 <sup>A</sup>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24,00 ± 1,00 <sup>F</sup>	15,33 ± 0,58 <sup>DE</sup>	24,00 ± 1,00 <sup>G</sup>	22,33 ± 1,15 <sup>C</sup>
<i>Enterococcus faecium</i>	23,33 ± 0,58 <sup>F</sup>	14,67 ± 1,15 <sup>E</sup>	25,00 ± 1,00 <sup>FG</sup>	23,00 ± 1,00 <sup>C</sup>

<sup>a</sup> Valeurs exprimées en moyenne ± écart type. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

En se référant à l'échelle citée par **Meena et Sethi (1994)** et **Ela et al., (1996)**. Les résultats obtenus peuvent s'interpréter comme suit :

L'HE du *Thymus pallescens* a une forte action inhibitrice sur *Staphylococcus aureus* et une action modérée sur *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus faecium* ;

L'HE du *Thymus dreatensis* est fortement inhibitrice du développement de *Staphylococcus aureus*, mais légèrement inhibitrice pour les deux autres bactéries Gram<sup>+</sup> ;

L'HE du *Thymus munbyanus* a une action modérément inhibitrice sur *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus faecium* et une forte action inhibitrice sur *Staphylococcus aureus* ;

L'*Origanum floribundum* a le même pouvoir inhibiteur que celui observé chez l'HE de *Thymus munbyanus* ;

La souche la plus sensible à l'action des HE testées est *Staphylococcus aureus*, par contre *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus faecium* ont pratiquement la même sensibilité vis-à-vis des HE étudiées.

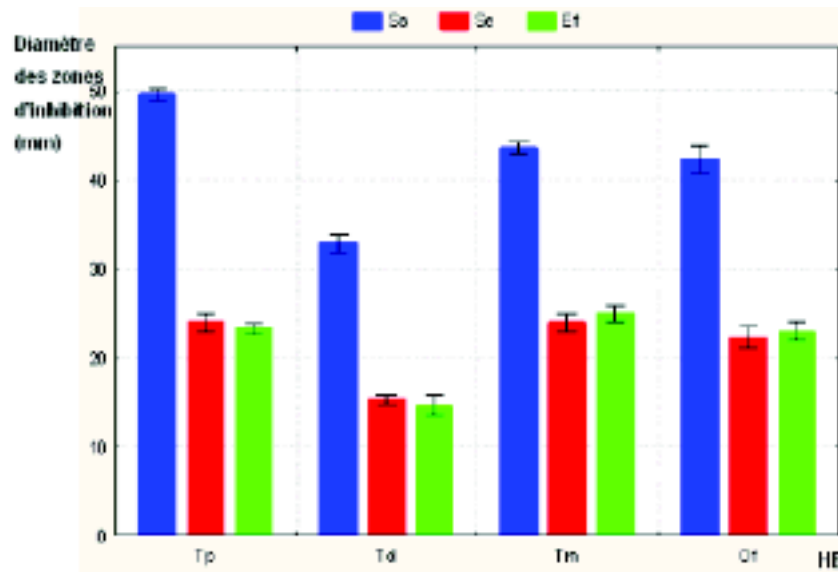


Figure 37 : Histogrammes des diamètres des zones d'inhibition des bactéries Gram+ en fonction des HE étudiées

Sa : *Staphylococcus aureus* ; Se : *Staphylococcus epidermidis* ;

Ef : *Enterococcus faecium*.

Les figures 38, 39 et 40 montrent les photographies des résultats obtenus sur boîtes de Pétri de l'activité antimicrobienne des HE testées sur les bactéries Gram<sup>+</sup>, après 24 h d'incubation.



Figure 38: Zones d'inhibition des HE testées sur *Staphylococcus aureus*

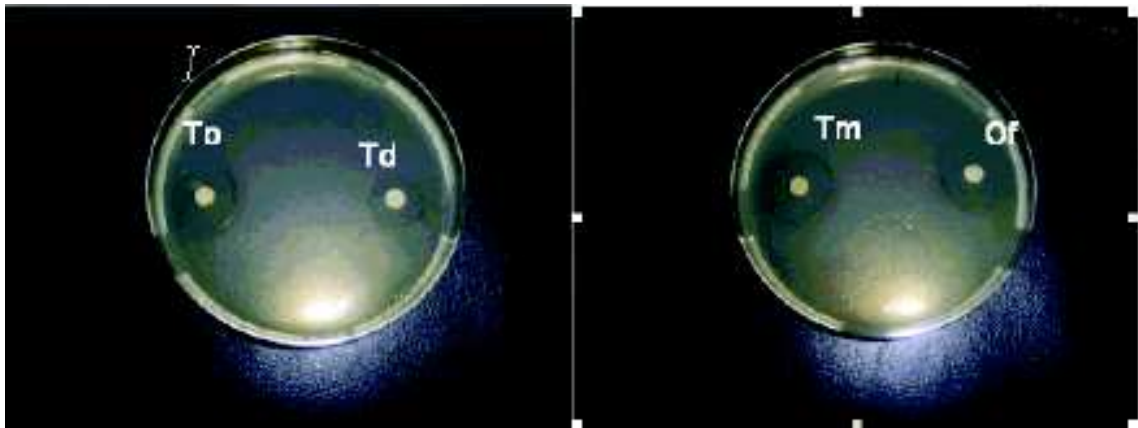


Figure 39: Zones d'inhibition des HE testées sur *Staphylococcus epidermidis*

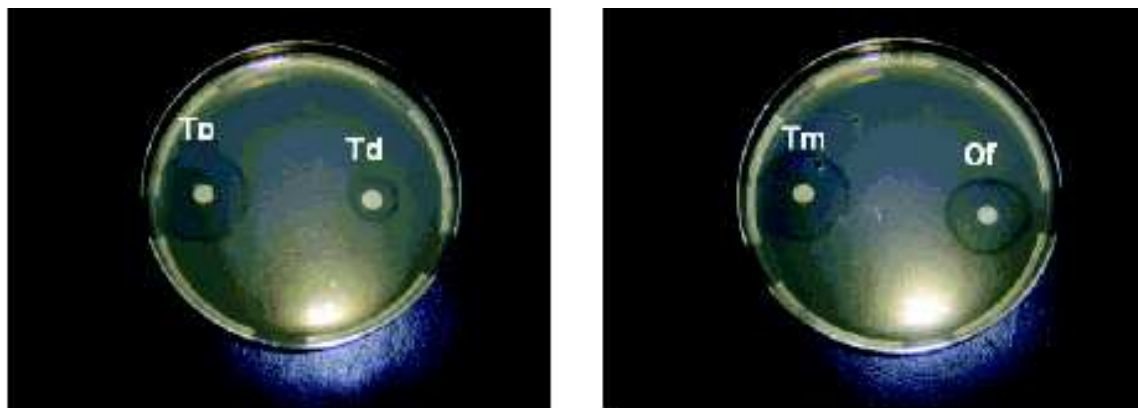


Figure 40 : Zones d'inhibition des HE testées sur *Enterococcus faecium*

## Les levures

Le Tableau 48 regroupe les résultats obtenus de l'activité inhibitrice des HE sur *Candida albicans*.

Tableau 48: Diamètres des zones d'inhibition<sup>a</sup> (en mm) dans le cas de *Candida albicans*.

Souche	<i>Thymus pallescens</i>	<i>Thymus dreatensis</i>	<i>Thymus munbyanus</i>	<i>Origanum floribundum</i>
<i>Candida albicans</i>	37,67 ± 0,58 <sup>C</sup>	27,67 ± 0,58 <sup>B</sup>	35,00 ± 1,00 <sup>C</sup>	31,33 ± 1,53 <sup>B</sup>

<sup>a</sup> Valeurs exprimées en moyenne ± écart type. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

Selon l'échelle citée précédemment, *Candida albicans* est fortement sensible à l'action des HE de : *Thymus pallescens*, *Thymus munbyanus* et *Origanum floribundum*. L'HE du *Thymus dreatensis* a une action modérément inhibitrice sur la levure testée.

Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'histogrammes à la figure 41.

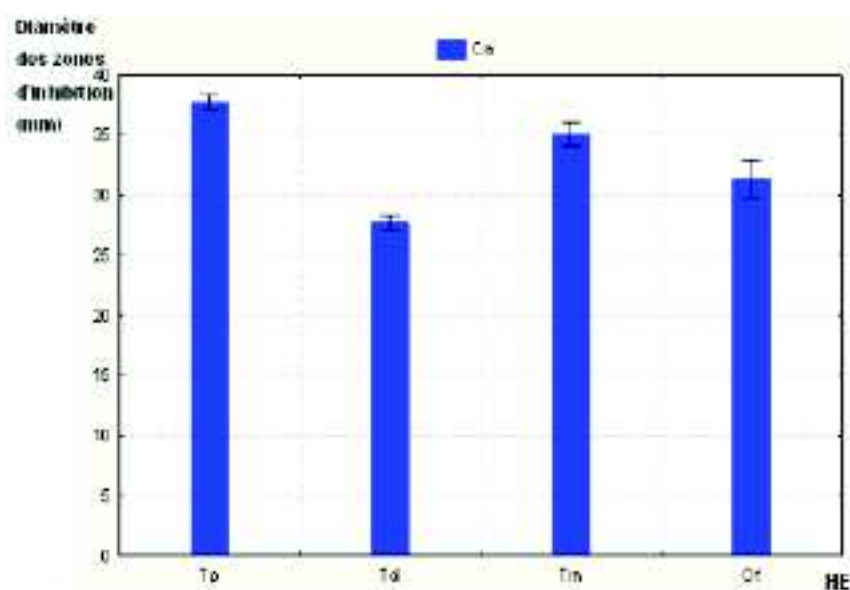


Figure 41: Histogrammes des diamètres des zones d'inhibition de *Candida albicans* en fonction des HE étudiées

Ca : *Candida albicans*

Les photographies prises sur les boîtes des Pétri relatives à l'activité antimicrobienne des HE testées sur *Candida albicans* sont données dans la figure 42.

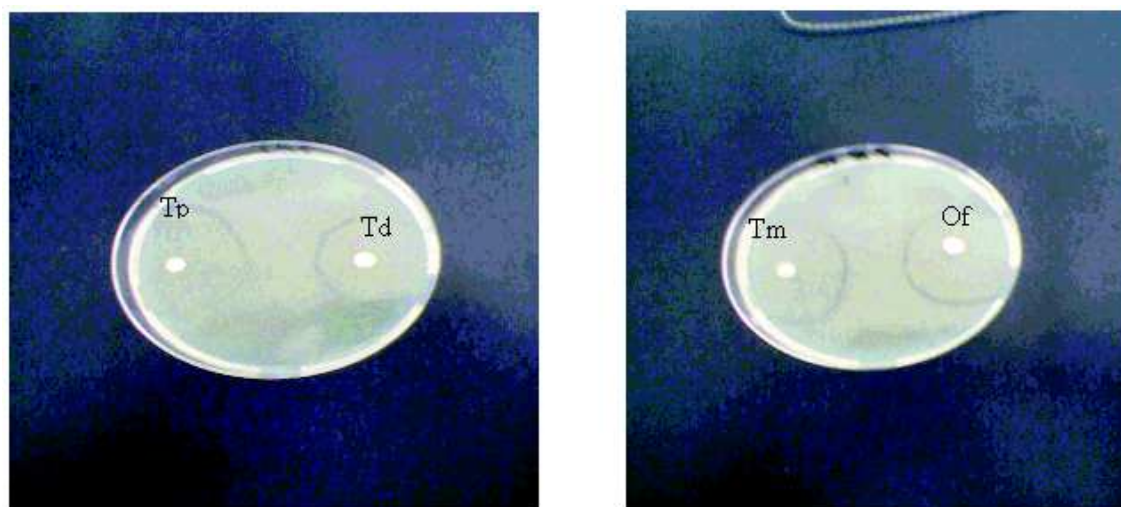


Figure 42 : Zones d'inhibition des HE testées sur *Candida albicans*

Il est connu depuis longtemps que les plantes ainsi que leur HE possèdent divers pouvoirs antimicrobiens vis-à-vis de plusieurs souche microbiennes qu'elles soient pathogènes ou non (Zaika, 1988, Beauchat et Golden, 1989, Ting et Derbel, 1992, Juven et al ., 1994, Chaibi et al ., 1997, Barrata et al ., 1998, Wan et al., 1998, Salmeron, 2003, Sari et al ., 2006).

Selon Valero et Salmeron (2003) et Pibiri (2005), il est difficile de faire une comparaison entre les résultats obtenus avec ceux rapportés par la littérature en raison des problèmes suivant :

Nature du matériel végétal (l'espèce, extrait ou l'HE, origine géographique, altitude, saison de cueillette) ;

- Procédé d'extraction ;
- Niveau de pureté du produit final et sa conservation ;
- Nature des souches testées ;
- Méthodes utilisées pour estimer l'activité antimicrobienne ;
- Milieux de culture employés (milieu synthétique ou naturel).

La qualité des souches tests est déterminante pour la valeur de l'essai, car celles-ci sont l'instrument de mesure dans la méthode de détermination de l'activité d'un produit antimicrobien (**Fleurette et al., 1995**).

Les résultats obtenus lors de ce travail rejoignent ceux trouvés par **Bousbia (2004)** en testant l'effet antimicrobien de HE de *Thymus pallescens* de Tablât (Médéa), d'*Origanum glandulosum* de Larbaa, de coriandre, de menthe, du romarin, du clou de girofle et du cyprès vert, sur plusieurs souches microbiennes. Il rapporte que toutes les souches bactériennes ont montré un certain degré de sensibilité aux huiles essentielles utilisées.

**Farbood et al. (1976)**, **Farag et al. (1989)**, **Nakatani (1994)**, **Smith-Palmer (1998)**, **Marino et al. (1999)**, **Mangena et Muyima (1999)**, **Inouye et al. (2001)** ont signalé que les bactéries Gram<sup>+</sup> sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram<sup>-</sup>. Par contre **Zaika (1988)**, **Hussein (1990)** ont montré que les bactéries Gram négatif sont généralement les plus sensibles à l'action des huiles essentielles que les bactéries Gram positif.

La faible sensibilité des bactéries Gram<sup>-</sup> à l'action des HE serait due à la présence d'une seconde membrane qui possède des chaînes hydrophiles de polysaccharides (LPS) jouant un rôle de barrière vis-à-vis les HE ayant un caractère hydrophobe (**Tassou et Nychas, 1995**, **Chao et al., 2000**, **Mann et al., 2000**, **Inouye et al., 2001**).

Cependant, **Deans et Ritchie (1987)** n'y trouvent pas de différence significative entre la sensibilité des bactéries Gram<sup>-</sup> et celle des bactéries Gram<sup>+</sup>, comme ce fut le cas des résultats obtenus. Les différentes bactéries Gram positif et Gram négatif testées manifestent une action variable à l'égard des huiles essentielles employées puisque *Klebsiella pneumoniae* (Gram<sup>+</sup>) a montré une grande sensibilité par rapport à celle de *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus faecium* qui sont des bactéries Gram<sup>-</sup>.

La forte sensibilité de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de toutes les HE du thym de l'origan confirme les résultats rapportés par **Sogdic et Ozcan. (2003)**, **Pibiri (2006)**, **Kabouche et al. (2005)** et **Sari et al. (2006)**.

*Pseudomonas aeruginosa* qui a la réputation d'être très résistante à toute sorte d'agents antimicrobiens et antibiotiques (**Pibiri, 2006**), s'est avérée très sensible à l'action des HE de *Thymus pallescens* et *Origanum floribundum*.

La résistance de cette bactérie est due à la capacité qu'elle possède pour former un biofilm. Ce dernier est une organisation complexe, composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se trouvent dans des états physiologiques spécifiques à leur situation. Ainsi, toute la population bactérienne n'est pas exposée simultanément et identiquement au produit. Il est établi que le traitement de telles bactéries nécessite des concentrations considérables d'agents antimicrobiens (**Fleurette et al., 1995**, **De Feo et al., 2003**, **Pibiri, 2006**).

Les HE sont essentiellement constituées d'hydrocarbures monoterpéniques. Ces derniers jouent le rôle de précurseurs des composés phénoliques à savoir :  $\alpha$ -Terpinène, p-cymène, carvacrol et thymol (Farag et al., 1989, Deans et Svoboda, 1990, Hulin et al., 1998, Rasooli et Mirmostafa, 2003 et Oussalah <sup>(1)</sup> et al., 2007). L'activité antimicrobienne des huiles essentielles du thym et d'origan est supposée être due à leurs constituants phénoliques (Sivropoulo et al., 1996, Davidson et Naidu, 2000, Karaman et al., 2004).

En effet, les HE avec des teneurs élevées en hydrocarbures monoterpéniques sont rapportés être très actives vis-à-vis des microorganismes. Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces (Cosentino et al., 1999). Cependant les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité, la totalité de la composition chimique doit être prise en compte (Cosentino et al., 1999).

Pina-Vas et al. (2004), ont observé l'effet antifongique de *Thymus vulgaris* (70 % carvacrol) et de *Thymus zygis* (40 % thymol) vis-à-vis de *Candida albicans*.

A titre d'indication, l'inhibition de la croissance de plusieurs souches microbiennes pathogènes par le carvacrol est rapportée par de nombreux auteurs (Conner, 1993, Juven et al., 1994, Kivanç et Akgul, 1994, Sivropoulo et al., 1996, Ultee et al., 1999, Ultee et al., 2000, Ultee et al., 2002, Kabouche et al., 2005, Knowles et al., 2005).

Ultee et al. (2002) signalent que l'action du carvacrol sur *Bacillus cereus* peut être due à sa nature très hydrophobe et à son accumulation au niveau de la membrane plasmique. Ce composé peut interagir avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire conduisant à une grande perméabilité, et une perte des constituants cellulaires (Sikkema et al., 1994, Thompson, 1996, Ultee et al., 1999).

En outre, l'affaiblissement de plusieurs systèmes d'enzymes, y compris ceux impliqués dans la production énergétique et la synthèse des composés structuraux, sont rapportés (Knobloch et al., 1986 ; Farag et al., 1989 ; Yeagle, 1989, Beuchat, 1994).

L'action du thymol est aussi comparable à celle de son isomère le carvacrol (Shapiron et Guggenheim, 1995, Shetty et Labbe, 1998, Dorman et Deans, 2000, Bagamboula et al., 2004, Pibiri, 2006). Selon Walsh et al. (2003), 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 potassium  $K^+$ . En revanche elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Ultee et al. (2002) ont montré qu'il existe une synergie entre l'action du carvacrol et celle du p-cymène en augmentant le volume membranaire et en déstabilisant la membrane plasmique.

Selon Chang et al. (2001) et Oussalah <sup>(1)</sup> et al. (2007), le pouvoir antimicrobien des HE est en relation directe avec plusieurs paramètres à savoir :

- La nature des composés majoritaires ;
- Concentration de ces composés ;
- Nature et structure des groupements fonctionnels ;
- L'interaction probable entre les différents constituants (synergie).

---

# Conclusion générale

L'évolution des esprits et le refus du « tout chimique » qui se manifeste de plus en plus ouvrent un peu plus la porte au « retour au naturel », c'est-à-dire au respect de l'essentiel, la vie.

La phyto-aromathérapie est la plus vieille thérapeutique du monde. Elle a toujours existé puisque les plantes n'ont jamais cessé d'être utilisées comme plantes condimentaires et/ou médicinales.

Les produits chimiques sont des substances mortes, donc dangereuses, perturbatrices des systèmes métaboliques naturels vitaux. À l'inverse, les huiles essentielles sont des produits naturels qui favorisent une revitalisation de l'organisme. Elles sont dites « eu biotiques », c'est-à-dire qu'elles participent à la vie.

Ce travail a été mené dans le cadre de la valorisation de la flore spontanée et ont concerné certaines plantes aromatiques et médicinales poussant en Algérie, à savoir : *Thymus pallescens*, *Thymus munbyanus*, *Thymus dreatensis* et *Origanum floribundum*. Toutes ces espèces sont endémiques algériennes dont certaines sont rares : *Origanum floribundum* et *Thymus munbyanus*.

L'extraction par hydrodistillation des HE a fourni des rendements intéressants (2,8–4,6 %). La cinétique d'extraction des différentes essences avec et sans broyage de la matière végétale a montré que la quasi-totalité des essences est extraite au bout des 45 premières minutes.

Les observations au microscope photonique des coupes histologiques de la tige et de la feuille du thym et de l'origan ont montré l'existence de poils sécréteurs, tecteurs et glandulaires.

L'analyse qualitative des HE étudiées sur une colonne capillaire polaire Stabilwax (PEG) par CPG, a permis d'identifier respectivement : **46**, **42**, **38** et **29** composés respectivement pour *Thymus pallescens*, *Thymus munbyanus*, *Thymus dreatensis* et *Origanum floribundum*. Cette même analyse sur les extraits de *Thymus pallescens* par différents solvants volatils à savoir : l'hexane, l'éther diéthylique, l'éthanol et le dichlorométhane a permis d'identifier respectivement : **42**, **21**, **31** et **35** composés.

Le fractionnement de l'HE de *Thymus pallescens* a permis d'obtenir deux fractions F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub> dont leur analyse par CPG a permis d'identifier respectivement : **42** et **40** composés.

L'analyse semi-quantitative sur une colonne capillaire non polaire **HP 5-MS** par CG/SM, a mis en évidence, la dominance des hydrocarbures monoterpéniques et de ses dérivés oxygénés.

L'étude analytique de HE de *Thymus pallescens* a présenté quatre constituants majoritaires où le carvacrol est le composé principal avec une teneur de 46,9 % suivi ensuite par le  $\gamma$ -Terpinène (14,2 %), le p-Cymène (10 %) et l' $\alpha$ -Terpinène (3,7 %). Celle des deux fractions a montré la présence de cinq composés majoritaires pour la F<sub>1</sub> et trois pour la F<sub>2</sub> dont le carvacrol reste le constituant essentiel avec une concentration atteignant les 81,4 % pour cette seconde fraction.

Cependant, l'HE de *Thymus dreatensis* est caractérisée par la dominance de trois composés à savoir: linalool (30,4 %), géraniol (19,6 %) et le thymol (20,2 %) suivi ensuite par  $\gamma$ -Terpinene (4,4 %), p-Cymène (4,0 %).

L'HE de *Thymus munbyanus* a révélé la présence de 05 composés majoritaires: le thymol (37,7 %), le p-Cymène (14,2 %), le  $\gamma$ -Terpinene (10,1 %), le carvacrol (8,4 %) et le  $\beta$ -Myrcene (7,1 %).

Pour l'HE d'*Origanum floribundum*, elle est caractérisée par la dominance d'un composé phénolique : le carvacrol (29,6 %) suivi par deux hydrocarbures monoterpéniques : p-Cymène,  $\alpha$ -Terpinene avec des teneurs de 18,5 et 13,7 respectivement. Par contre le thymol est présent avec uniquement 8,4 %.

Toutes les espèces étudiées manifestent une certaine activité antioxydante en comparaison avec le BHT, le BHA et l' $\alpha$ -tocophérol. Le degré d'inhibition de l'oxydation lipidique varie en fonction de la concentration en huile essentielle et de la méthode employée. Dans la majorité des tests, *Origanum floribundum* est l'espèce la plus active suivie par *Thymus munbyanus* et *Thymus pallescens*.

L'efficacité relative des HE de ces trois espèces peut être attribuée à la présence de composés phénoliques à savoir le thymol et le carvacrol qui sont considérés comme étant des antioxydants primaires mais ils ne sont pas exclusivement responsables de cette activité puisque d'autres composés dits minoritaires peuvent y participer comme dans le cas de *Thymus dreatensis*.

L'étude de l'activité antimicrobienne des HE a révélé que ces dernières ont une action inhibitrice vis-à-vis des souches microbiennes testées.

D'après les résultats obtenus, la plus grande valeur d'inhibition enregistrée sur les six souches bactériennes et sur la levure, est celle de l'HE de *Thymus pallescens* et la plus grande résistance est signalée avec l'HE de *Thymus dreatensis*.

Parmi les micro-organismes testés, *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible à l'action des HE. *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus epidermidis* sont les plus résistantes à l'action de ces HE.

Cette étude montre également que le pouvoir antimicrobien des HE peut être attribué à leurs composants majoritaires (thymol et carvacrol principalement) mais il ne faut pas négliger les constituants mineurs qui peuvent avoir une action significative sur l'activité antimicrobienne des HE.

Dans la perspective de poursuivre et d'approfondir ce travail, il serait nécessaire :

D'étudier l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de ces plantes et de les comparer par rapport à celles des huiles essentielles.

De réaliser des essais avec des phénols synthétiques, thymol et carvacrol, et comparer leurs activités avec celles des huiles essentielles.

De tester d'autres méthodes d'extractions et leurs influences sur la composition chimique et les capacités biologiques.

De déterminer les CMI et CMB pour chaque HE étudiée.



---

# Références bibliographiques

- Afnor, 2000.** Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle. Ed. Afnor, Paris.
- Aggoune K., Harfi B., 2006.** Huiles essentielles de thym et d'origan: Composition chimique et activité antimicrobienne. Memoire Ingenieur, INA. Alger.
- Anonyme, 2005.** Huile Essentielle: principales propriétés et caractéristiques. [www.penntybio.com/huile](http://www.penntybio.com/huile) .
- Anwar F., Bhangar M. I., et Kazi T. G., 2000.** Activity of phenolic antioxidants on the storage ability of soybean cooking oil. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 1333–1335.
- AOCS, 1989.** Peroxide value using chloroform. Official method Cd-8-53. In *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist' Society*. 4th ed.
- Arnal-Schnebelen B., Hadji-Minaglou F., Peroteau J-F., Ribeyre F., de Billerbeck V.G., 2004.** Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. *The International Journal of Aromatherapy*, **14**, 192–197.
- Aruoma O., Laughton M.J. and Halliwell B. , 1989.** Carnosine, homocarnosine and anserine: could they act as antioxidant actions. *Journal of American Oil Chemist's Society*, **73**, 1617-1625.
- Anon, 2003.** Major groups, families and Genera: Lamiaceae (Labiatae). *Science and Horticulture*, Royal Botanic Garden. Kew UK.
- Azzoudj S., 1999.** Valorisation des huiles essentielles de quelques espèces d'*Origanum* et *thymus* spontanées en Algérie. Thèse Ing., Institut d'Agronomie, Blida.
- Babouri L., 2003.** Huiles essentielles du thym (*Thymus fontaneseii*) : extraction, analyse et évaluation de l'activité antioxydante sur une huile alimentaire. Mémoire Ingénieur, INA, Alger.
- Bagamboula C.F., Uyttendaele M., Debevere J., 2004.** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-Cymène towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, **21**, 33–42.
- Banthorpe D.V., Charwood B.V., 1972.** Chemistry of terpènes and terpenoïdes. Ed.A.A. *New man Academic Press*, London and New York, 337-374.
- Baratta M.T., Dorman H.J.D., Deans S.G., Figueiredo A.C., Barroso J.G. et Ruberto G., 1998.** Antimicrobial and Antioxidant Properties of Some Commercial Essential Oils. *Flavour and Fragrance Journal*, **13**, 235-244.
- Basaga H., Tekkaya C. and Acikel F., 1997.** Antioxidative and Free Radical Scavenging Properties of Rosemary Extract. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* , **30**, 105- 108.
- Baser K.H.C., Ozek T., Kurkcuoglu M. and Tumen G., 1992.** Composition of the essential oil of *Origanum sipyleum* of Turkish origin. *Journal of Essential Oil Research*, **4**, 139-142.

- Baser K.H.C., Ozek T., Tumen G. and Sezik E., 1993.** Composition of the essential oils of Turkish *Origanum* species with commercial importance. *Journal of Essential Oil Research* , 5619-623.
- Basil A., Jimenez-carmona M.M. and Clifford A.A., 1998.** Extraction of rosemary by super heated water. *Journal of food chemistry*, **46**, 5205-5209.
- Belaiche, P., 1979.** "L'aromatogramme". Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. M. S. A. Editeur, Paris. Tome 1, 204.
- Belhattab R., Larous L., Cristina Figueiredo A., Santos Pedro A. G., Barroso José G. et Pedro Luis G., 2005.** *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria: essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour Fragrance Journal*,**20**, 209–212.
- Benhabiles N.E., 1995.** Comparaisons des huiles essentielles de deux espèces Algériennes de romarin : extraction et étude analytique. Thèse magister, ENP, Alger.
- Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A., 1988.** Extraction des huiles essentielles. *Chimie et technologie. Information chimie*.
- Berset C. et Cuvelier M. E., 1996.** Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sciences des Aliments*, **16**, 219-245.
- Beuchat L.R., Golden D.A., 1989.** Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*,**43**, 134 – 142.
- Blackway J., Salerno M., 1987.**Pour la science. Institut des renseignements scientifiques et techniques, Paris.
- Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S. et Abrini J., 2006.** *Thymus* essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc, 09- 12 Mai 2006.
- Bousbia N., 2004.** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (Nigelle, Coriandre, Origan, Thym, Romarin) : Etude de leurs activités antimicrobiennes. Th. magister, INA, Alger, 130 P.
- Bowles B.L., Sackitey S.K., Willams A.C., 1995.** Inhibitory effects on flavor compounds on *Staphylococcus aureus* WRRC B 124. *Journal of Food Safety*, **15**, 337-347.
- Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> Ed. *Lavoisier*, 385-623.
- Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. *Lavoisier*, *Tech. et doc.*, 3<sup>ème</sup> Ed., Paris.
- Burits M. et Bucar F., 2000.** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, **14**, 323-328.
- Burits M., Asres K., Bucar F., 2001.** The antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia afra*, *Artemisia absyssinica* and *Juniperus procera*. *Phytotherapy research*, **15**, 103- 108.
- Burt S. A. et Reinders R. D., 2003.** "Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7". *Letters in Applied Microbiology*, **36**, 162-167.

- Carmo M.M., Frazao S. and Venancio F., 1989.** The chemical composition of Portuguese *Origanum vulgare* oils. *Journal of Essential Oil Research*, **1**, 69-71.
- Carson C. F. et Riley T. V., 1995.** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, **78**, 264-269.
- Castera-Rossignol A. et Bosque F., 1994.** Nouvelle approche des antioxydants. *Oleagineux Corps gras Lipides*, **1**, 131-143.
- Cerrutti P., Alzamora S.M., 1996.** Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purees. *International Journal of Food Microbiology*, **29**, 379-386.
- Chaibi A., Ababouch L.H., Belasri K., Boucetta S., Busta F.F., 1997.** Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiology*, **14**, 161 – 174.
- Chang S. T., Chen P. F. and Chang S. C., 2001.** Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, **77**, 123–127.
- Chikhoun A., 2004.** Huiles essentielles d'espèces endémiques algérienne : composition chimique et l'activité antioxydante vis a vis de l'huile de tournesol. Mémoire Ingénieur, INA, Alger, 118.
- Chao S.C., Young D.G. et Oberg G.J., 2000.** Screening for inhibitory activity of Essential Oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, **12**, 639-649.
- Chazan J. B. et Szulc M., 1987.** *Cahiers nutrit diét*, **22**, 66-76.
- Chen X. C., Ahn D. U., 1998.** Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe<sup>+2</sup> or ultraviolet light. *Journal of American Oil Chemist's Society*, **75**, 1717–1721
- Chevolleau S., 1990.** Etude de l'activité antioxydante des plantes: importance de l'alpha tocophérol. Thèse de Doctorat, Faculté des sciences et techniques de Saint Jérôme, Aix-Marseille, 186.
- Chevolleau S., Debal A., Ucciani E., 1992.** *Revue Française des Corps gras*, **1-2**, 3-8.
- Cicile J.-C., 1994.** Distillation. Absorption 1. Généralités sur les colonnes de fractionnement. *Techniques de l'ingénieur J.*, **2621**, 1-3.
- Cicile J.-C., 2002.** Distillation. Absorption Etude pratique. *Techniques de l'ingénieur J.*, **2610**, 1-20.
- Cillard J. et Cillard P., 1987.** Antioxydant activity of associated alpha tocopherol and ascorbic acid in aqueous media. *Revue Francaise des Corps Gras*, **34**, 271-274.
- Conner D. E., 1993.** Naturally occurring compounds, 441-468. In Davidson P. M. and Branen A. L. Antimicrobials in foods, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y
- Corongiu F.P. and Banni S., 1994.** Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods in Enzymology*, **233**, 303-313.
- Cosentino S., Tuberoso C. I. G., Pisano B.,<sup>1</sup> Department of Experimental Biology, University of Cagliari, Sardinia, Italy and Satta M., Mascia V., Arzedi**

- E. and Palmas F., 1999.** In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, **29**, 130-135.
- Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L., Bell <sup>2</sup> Australian Tea Tree Oil Research Institute, Lismore, New South Wales and H. C., Gustafson J. E., Warmington J. R. and Wyllie S. G., 2000.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 170-175.
- Crapiste G. H., Bredvan M. I. V. et Caralli A., 1999 .** Oxidation of sunflower oil during storage. *Journal of American Oil Chemist's Society* , **76**, 1437- 1443 .
- Cuendet M., Hostettmann K. et Potterat O., 1997.** Iridoid glycosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* , **80**, 1144-1152.
- Dapkevicius A., Venskutonis R., Van Beek T. A., et Linssen P. H., 1998.** Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **77**, 140–146.
- Das N.P. et Preira T.A., 1990.** Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil : structure activity relationships. *Journal of American Oil Chemist's Society*, **67**, 255-258.
- Davidson P.M., Parish M.E., 1989.** Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. *Food Technology*, **43**, 148-155.
- Davidson P.M., Naidu A.S., 2000.** Phyto-phenol. In: Naidu, AS. (Ed.), *Natural Food and Antimicrobial Systems*. CRC Press, Boca Raton, FL, 265–294.
- Deans, S. G. et Ritchie G., 1987.** Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, **5**, 162-180.
- Deans S.G., Svoboda K.P., 1989.** Antibacterial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil and its constituents. *Journal of Horticultural Science*, **64**, 205–210.
- Deans S.G., Baratta T., Dorman D., Biondi D.M. et Ruberto G., 1998.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of Laurel, Sage, Rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, **10**, 618- 627.
- De Billerbeck G., 2000.** Activité fongique de l'huile essentielle de cymbopogon nardus sur l'*Aspergillus 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.
- Decker E.A. and Xu Z., 1998.** Minimizing rancidity in muscle food. *Food technology*, **52** 54-61.
- De Feo V., Bruno M., Tahiri B., Napolitano F. Et Senatore F., 2003.** Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Thymus spinulosus* Ten. (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 3849-3853.
- Deighton N., Glidewell M., Deans S. G. Goodmann B. A., 1993.** Identification by EPR spectroscopy of free radicals in the oxidation of plant essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **63**, 221-225.
-

- Delaigne R., 1930.** Les essences naturelles et parfums, Ed. Armond colin, Paris.
- Didry N., Dubreuil L., Pinkas M., 1993.** Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldehyde cinnamique seuls ou associés. *Pharmacize*, **48**, 301-304.
- Diplock A.T., 1997.** Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free radical research*, **27**, 511-532.
- Djerrari A. et Crouzet J., 1985.** Influence du mode d'extraction sur la composition de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*). 4ème journée scientifique internationale, Digne-les-bains.
- Dobarganes M.C. and Velasco J., 2002.** Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 420-428.
- Donelli J. K. et Robinson D. S., 1995.** Free radicals in foods. *Free Radical Research*, **22**, 147-176.
- Dorman D. H.J., Deans S.G. et Noble R., 1995.** Evaluation in vitro of plant essential oil as naturel antioxidants. *Journal of Essential Oil Research*, **7**, 645-651
- Dorman H. J. D. et Deans S. G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 308-316.
- Dorman D.H.G., Bachmayer O. , Kosar M . et Hiltunen R . , 2004.** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Tuekey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 762-770.
- Drozdowski B., Szukalskae, 1987.** A rapid instrumental method for the evaluation of the stability of fats. *Journal of American Oil Chemist's Society*, **64**, 1008-1010.
- Durvelle J.P., 1930.** Fabrication des essences et des parfums. Ed. des gorges, Paris.
- Dziedzic S., Robinson L., Hudson J. F., 1986.** Fate of Propyl Gallate and Diphosphatidylethanolamine in Lard during Autoxidation at 120 °C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**, 1027-1029
- Ela M.A., El-Shaer N.S., et Ghanem N.B., 1996.** Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, **51**, 993 – 995.
- Eymard S., 2003.** 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. These Doctorat, Université de Nantes, France, 277.
- Fadli S., Kessi A., 2005.** Composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles du thym et de l'origan : *Thymusnumidicus* Poiret et *origanum floribundum* Munby. Memoire Ingénieur, INA, Alger, 92.
- Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venâncio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C. Barroso J.G. and. Pedro L.G** Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, **36**, 35-40.
- Faleiro L., Miguel G., Gomes S., Costa L., Venancio F., Teixeira A., Figueiredo A.C., Barroso J. G., Pedro L. G., 2005.** Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolate from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum Vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry J*, **53**, 8162-8168.

- Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F.M. & El-Baroty G. S. A., 1989.** Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*, **52**, 665–7.
- Farbood M.I., Macneil J.H., et Ostovar K., 1976.** Effects of rosemary spice extractive on growth of microorganisms in meats. *Journal of milk and food technology*, **39**, 675 - 679.
- Fauchère J.L. et Avril J.-L., 2002.** Bactériologie générale et médicale: Ellipses Editions Paris, 365.
- Fleurette J, Freney J, Reverdy M.E., 1995.** Antiseptie et désinfection. *ESKA*, 199-221
- Franchomme P., Pénoël D. et al ., 1990.** Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique: matière, énergie, information". *L'aromathérapie exactement*. R. J. Editeur. Limoges. **2**, 73-227.
- Frankel E.N., Neff W.E. and Weisleder D., 1990.** Determination of methyl linoleate hydroperoxides by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods in Enzymology*, **186**, 380-387.
- Frankel E. N., Huang S. W., Kanner J., & German J. B., 1994.** Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **42**, 1054–1059.
- Frankel E.N., 1998.** Lipid oxidation. *The Oily Press*. **10**. Dundee, Scotland.
- Friedland D., 1975.** Industrie américaine des substances aromatiques. *Informations chimie*, **140**, 65-68.
- Friedman M., Henika P.R., & Mandrell R.E., 2002.** Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, **65**, 1545–1560.
- Garcia -Mesion J. A., Luque de Castro M.D., Valcerel M., 1993.** Factors affecting the gravimetric determination of the oxidative stability of oils. *Journal of American Oil Chemist's Society*, **70**, 245-247.
- Garland S., 1980.** Le livre des herbes et des épices. Ed.Fernand Nathan, Paris, 288.
- Garnero M.J., 1977.** Problèmes rencontrés au cours de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles. In *Parfums cosmétiques, aromes*, **14**, 31-40.
- Garnero J., 1996.** Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur, 1-45.
- Genot C., Kansci G., Laroche M., 1994.** Measurement of phospholipids oxidation in model membranes by determinations of oxygen consumption with a semi-automatic polarographic method. *Science des Aliments*, **14**, 673-682.
- Genot C., 2000.** Congélation et qualité de la viande. Techniques et pratiques, INRA Editions, Paris
- Genot C., Meynier A., Riaublanc A. and Chobert J.M., 2003.** Protein Alterations Due to Lipid Oxidation in Multiphase Systems. In *Lipid oxidation pathways*, amal-Eldin A. (Ed.), AOACS Press Champaign, 265-292.
- German J.B. and Kinsella J.E., 1985.** Lipid oxidation in fish tissue. Enzymatic initiation via lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **33**, 680-683.

- Gertz C., Klostermann S., and Kochhar S. P., 2000.** Testing and comparing oxidative stability of vegetable oil and fats at frying temperature. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **102**,543–551.
- Giamperi L., Fraternali D. et Ricci D., 2002.** The In Vitro Action of Essential Oils on Different Organisms. *Journal of Essential Oil Research**Journal of Essential Oil Research J*, **14**, 312-318.
- Gray J.I., 1978.** Measurement of lipid oxidation: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **55**, 539-545.
- Gray J.I. and Monahan F.J., 1992.** Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trend in Food Sciences and Technology*, **3**, 315-318.
- Griffin S. G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.N., 1999.** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, **14**, 322-332.
- Guenther E., 1972.** The essential oils, Vol.3, Ed. Robert Krieger publishing co, Huntingtons, New York.
- Guignard J.L., 1996.** Biochimie végétale. Ed. Masson, Paris.
- Guiraud J.P., 2003.** Microbiologie Alimentaire. Ed. Dunod, Paris, 652.
- Gunstone Fo., Norris Fa., 1983.** In: lipids in Food-Chemistry. *Biochemistry and Technology*, Pergamon Press, 161- 165.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. et Aruoma O.I., 1987.** The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, **165**, 215–219.
- Hammer K.A., C.F. Carson et Riley T.V., 2003.** Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 853-860.
- Han D., Yi OS., Shin M.K., 1990.** *J. Food Sc.*, **55**, 247-249.
- Hao Y.Y., Brackett R.E., Doyle M.P., 1998a.** Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiology*, **15**, 367–378.
- Hao Y.Y., Brackett R.E., Doyle M.P., 1998b.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. *Journal of Food Protection*, **61**, 307–312.
- Haraguchi H., Saito T., Ishikawa., Date H., Kataoka S., Tamura Y., Mizutani K., 1996.** Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*. *Planta Medica*, **62**, 217-221.
- Hazzit M. , Baaliouamer A., Faleiro M.L. and Miguel M.G., 2006.** Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 6314 -6321.
- Helander I. M., Alakomi H. L., Latva-Kala K. and Mattila T., 1998.** Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram- bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3590-3595.
- Hermal C., 1993.** 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.

- Hohmann B., 1968.** Zwei weniger bekannte Gewuerzkraeuter *Origanum virens* and *Coridothymus capitatus*. *Z. Lebensm. Unters. und Forschung*, **138**, 212-216.
- Hsieh R.J. and Kinsella J.E., 1989.** Lipoxygenase Generation of Specific Volatile Flavor Carbonyl Compounds in Fish Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**, 279-286.
- Hultin H.O., 1992.** Lipid Oxidation in Fish Muscle. In Advances in seafood biochemistry: Composition and quality Flick G.J. and Martin R.E. (Eds.), *Technomics Publishing Compagny Inc*, Lancaster, 99-122.
- Hulin V., Mathot A.G., Mafart P. et Dufossé L., 1998.** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, **18**, 563-582.
- Hultin H.O., 1994.** Oxidation of lipids in seafoods. In Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality. Shahidi F. and Botta J.R. (Eds), *Blackie Academic & Professional*, New York, 49-74.
- Hussein A.M.S., 1990.** Antibacterial and antifungal activities of some Libyan aromatic plants. *Planta Medica*, **56**, 644 – 649.
- Inouye S., Takizwa T. et Yamaguchi H., 2001.** Antibacterial Activity of Essential oils and Their Major Constituents Against Respiratory Tract Pathogens by Gaseous Contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **47**, 565-573.
- Inouye S., 2003.** Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). *International Journal of Aromatherapy*, **13**, 95-107.
- Iqbal S. Bhangar M.I., 2007.** Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, **100**, 246–254.
- Jacobsen C., 1999.** Sensory impact of lipid oxidation in a complex food systems. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **101**, 484-492.
- Jalas J., 1971.** Note of *Thymus* L. (*Labiatae*) in Europe.I. Supraspecific classification and nomenclature. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **64**, 199-215.
- Jay J.M., Rivers G.M., 1984.** Antimicrobial activity of some food flavorng compouds, *Journal of Food Safety*, **6**, 129-139.
- Jiang Z.Y., Hunt J.V. and Wolff S.P., 1992.** Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 384-389.
- Judde A., 2004.** Prevention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmetique. *Oleagineux Corps gras Lipides*, **11**, 414-418.
- Juven B. J., Kanner J., Schved F. and Weisslowicz H., 1994.** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, **76**, 626-631.
- Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z., Benlabed K., 2005.** Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*, **15**, 129–133.
- Kabouche A., Kabouche Z. et Bruneau C., 2005.** Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* (Poiret) from Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*, **20**, 235–236.



- Kamil J.Y.V.A., Jeon Y.-J. and Shahidi F., 2002.** Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*, **79**, 69-77.
- Kanner J., German J.B. and Kinsella J.E., 1987.** Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Food Science and Nutrition*, **25**, 317.
- Kansci G., Genot C., Meynier A. and Gandemer G., 1997.** The antioxidant activity of carnosine and its consequences on the volatile profiles of liposomes during iron/ascorbate induced phospholipid oxidation. *Food Chemistry*, **60**, 165-175.
- Karaman S., Ilcim A., Digrak M., 2004.** Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Origanum bargyli* Mouterde from Turkey. *Journal of Essential Oil Research : JEOR*, **16**, 517-519.
- Kazuhisa Y., 2001.** Oils and fats. *Reito*, **76**, 405–409.
- Ke P.J., Ackman R.G., Linke B.A. and Nash D.M., 1977.** Differential lipid oxidation in various parts of frozen mackerel. *Journal of Food Technology*, **12**, 37-47.
- Khayat A. and Schwall D., 1983.** Lipid oxidation in seafood. *Food Technology*, 130-140.
- Kivanç M., and Akgul A., 1988.** Effect of some essential oil components on the growth of food-borne bacteria and synergism with some food ingredients. *Flavour and Fragrance Journal*, **3**, 95-98.
- Klein R.A., 1970.** The detection of oxidation in liposome preparations. *Biochemistry and Biophysic Acta*, **210**, 486-489.
- Knobloch K., Weigand H., Weis N., Schwarm H.M. et Vigneschow H., 1986.** Action of terpenoids on energy metabolism. In *Progress in Essential oil Research* ed. Brunke, E.J., 429-445. Berlin, De Gruyter.
- Knowles J. R., Roller S., Murray D. B. and Naidu A. S., 2005.** Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 797–803.
- Kokkini S. and Vokou D., 1989.** Carvacrol-rich plants in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, **4**, 1-7.
- Kokkini S., Vokou D. and Karousou R., 1991.** Morphological and chemical variation of *Origanum vulgare* L. in Greece *Bot. Chron.*, **10**, 337-346.
- Koleva I. I., Van Beek T. A., Linssen J. P. H., De Groot A., et Evstatieva L. N., 2002.** Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, **13**, 8–17.
- Kordali S., Kotan R., Mavi A., Cakir A., Ala A., Yildirim A., 2005.** Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculoides* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 9452-9458.
- Kortenska V.D., Yanishlieva N.V., Kasaikina O.T., Totzeva I.R., Boneva M.I. and Russina I.F., 2002.** Phenol antioxidant efficiency in various lipid substrates containing

- hydroxy compounds. *European Journal of Lipid Sciences and Technology*, **104**, 513-519.
- Koskas J.P., Cillard J. and Cillard P., 1983.** Direct high-performance liquid chromatographic separation of hydroperoxide isomers of linoleic acid. *Journal of Chromatography*, **258**, 280-283.
- Kuçuk Murat, Kolaylı S., Karaoglu S., Ulusoy E., Baltacı C., Candan F., 2007.** Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, **100**, 526-534.
- Kulisić T., Radonić A., Katalinić V., Milos M., 2004.** Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, **85**, 633-640.
- Kumaran A. et Karunakaran R.J., 2006.** Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food chemistry*, **97**, 109-114.
- Kunchandy E. et Rao M. N. A., 1990.** Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmacognosy*, **58**, 237-240.
- Kunle O., Okogun J., Egamana E., Emojevwe E., Shok M., 2003.** Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*, **10**, 59-61.
- Lahlou M., 2004.** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, **18**, 435-448.
- Lambert R. J. W., Skandamis P. N. Coote P.J., Nychas G.J.E., 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, 453-462.
- Lampi A.M., Kataja L., Kamal-Eldin A., Vieno P., 1999.** *JAOCS*, **76**, 749–55.
- Love R.M., 1980.** The Chemical Biology of Fishes. *Academic Press London*, **2**, 1968-1977.
- Lawrence B.M. and Reynolds R.J., 1984.** The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfumer and Flavorist*, **9**, 41-51.
- Lea C.H., 1946.** The determination of the peroxide values of edible fats and oils: the iodometric method. *Journal of the Society of Chemical Industry*, **65**, 286-291.
- Lee S-J., Umano K., Shibamoto T., Lee K-G., 2005.** Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, **91**, 131–137.
- Le Louarn P., 1994.** Guide pratique de l'aromathérapie : Mieux être, mieux vivre par l'aromathérapie. Ed. De Vecchis S.A., Paris, 138.
- Lessoued S., 1998.** Etude de la fraction volatile d'une matrice alimentaire riche en lipide en fonction de divers traitements. Application à la détection du traitement ionisant. Thèse doctorat, Marseille, France.
- Leybros J. et Fremeaux P., 1990.** Extraction solide-liquide, aspect théorique. Techniques de l'ingénieur, 7-8.
- Lin Y. T., Labbe R. G., Kalidas S., 2005.** Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **6**, 453 – 458.

- Lis-Balchin M., Hart S. L. Deans S.G., 2000.** Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils, originating in Australia and New Zealand" *Phytotherapy Research*, **14**, 623-629.
- Liu H., and White P. J., 1992.** Oxidative stability of soybean oils with altered fatty acid compositions. *Journal of American Oil Chemist's Society*, **69**, 528–532.
- Lu F., Foo L.Y., 2001.** Antioxidant activity of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, **75**, 197- 202.
- Madsen H.L., Sorensen B., Skibsted L.H. et Berteisen G., 1999.** The antioxidative activity of summer savory and rosemary in dressing stored exposed to light or in darkness. *Food Chemistry*, **63**, 173-180.
- Mailhebiau P., 1994.** La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne, 635.
- Makhlouf H., 2002.** Les huiles essentielles du romarin et du clou de girofle approche analytique et active antioxydante sur une huile alimentaire. Memore Ingénieur, INA, Alger.
- Mangena T. et Muyima N.Y.O., 1999 :** Comparative evaluation of the antimicrobial activities of Essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters in Applied Microbiology*, **28**, 291-296.
- Mann C. M. et Markham J. L., 1998.** A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 538-544.
- Mann C. M., Cox S. D. & Markham J. L., 2000.** The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 contributes to its tolerance to the **essential oil** of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil ). *Letters in Applied Microbiology*, **30**, 294–7.
- Marino M., Bersani C. et Comi G., 1999 ,** Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus vulgaris* L. Measured Using a Bioimpedometric Method. *Journal of Food Protection*, **62**, 1017 -1023.
- Martel P. et Pescal G., 1992.** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires, Paris, Ed. Lavoisier, Tec. Et Doc., 191-215.
- Mayer G.B., 1989.** Produits PFI- CO<sub>2</sub>, une nouvelle génération de produits pour l'alimentation extraits au CO<sub>2</sub>. *Industries Agro-Alimentaires*, 847-853.
- Medina I., Satué-Gracia M.T. and Frankel E.N., 1999.** Static headspace gas chromatographic analyses to determine oxidation of fish muscle lipids during thermal processing. *Journal of American Oil Chemist's Society*, **76**, 231-236.
- Meena M.R. et Sethi V., 1994.** Antimicrobial activity of the essential oils from spices. *Journal of Food Science and Technology Mysore*, **31**, 68 – 70.
- Mighel G., Simoes M., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. et Carvalho L., 2004.** Composition and antioxydant activities of the essential oils of thymus caespititus, Thymus Camphoratus and Thymus mastichina. *Food chemistry*, **86**, 183-188.
- Mimica-Dukic N., Bozin B., Sokovic M. et Simin N., 2004.** Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 2485-2489.

- Moleyar V. et Narasimham P., 1992** : Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*, **16**, 337-342.
- Montes-Belmont R., Convajal M., 1998**. Control of *Aspergillus flavus* in Maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection*, **61**, 616–619.
- Morelle J., 1988**. *Parfums, Cosmétiques, Aromes*, **80**, 91-104.
- Morales R., 1997**. Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area. *Lagasalia*, **19**, 249-262.
- Moulin J.P., Pareau D., Rakib M. et Stambouli M., 2002**. Transfert de matière. Extraction liquide – liquide. Techniques de l'ingénieur, 1–13.
- Nakatani N. et Kikuzaki H., 1987**. A new antioxydative glucoside isolated from Oregano (*Origanum vulgare* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, **51**, 2727-2732.
- Naves Y.R., 1964**. Qu'est ce qu'une huile essentielle. Ed. Masson. Paris.
- Nielsen P.V., Rios R., 2000**. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, **60**, 219–229.
- Ohkawa H., Ohishi N. et Yagi K., 1979**. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobabitic acid reaction. *Analytical Biochemistry*, **95**, 351-358.
- Ohm A.V., Stockmann H., Schwarz K., 2005**. The more – The better? Estimating the inhibitory activity of alpha-tocopherol towards lipid oxidation. *Journal of Phytophysiology*, **162**, 785- 789.
- Oussalah <sup>(1)</sup> M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M., 2007**. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **18**, 414-420.
- Oussalah <sup>(2)</sup> M., Caillet S., Saucier L. et Lacroix M., 2006**. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat science*, **73**, 236-244.
- Oyaizu M., 1986**. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, **44**, 307-315.
- Ozkan G., Sagdic O., Baydar N.G. et Baydar H., 2003**. Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. *Food Science and Technology International*, **9**, 85-88.
- Padulosi S., 1997**. Oregano. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, Valenzano (Bari), Italy; IPGRI: Rome, Italy.
- Paquot C. et Cuvier P., 1979**. *Rev. Fan. Corps gras*, **6-7**, 275- 277.
- Paris R., Godon M., 1979**. Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.
- Pattnaik S., Subramanyam V.R., et al ., 1996**. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbiology*, **86**, 237-246.

- Pibiri M.C., C. Seigniez et al ., 2001.** 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.
- Pibiri M.C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, Lausanne, Canada, 177.
- Pascal G., 1978.** *Revue Française des Corps gras*, **5**, 239\_ 243
- Pellerin P., 2001.** Extraction par le CO<sub>2</sub> à l'état supercritique. *Annales des Falsifications, de L'Expertise Chimique*. **94**, 51-62.
- Pignatti S., 1982.** Flora d' Italia. *Edagricole, Bologna*, **2**, 486-487.
- Pina-vaz, C., Gongalves Rodrigues A., Pinto E., Costa-de-Oliveira S., Tavares C., Salgueiro L., Cavaleiro C., Gonçalves M.J., Martinez-de-Oliveira J., 2004.** Antifungal activity of thymus oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **18**, 73–78.
- Pin-Der-Duh P.D., 1998.** Antioxidant activity of budrok (*Arctium lappa* L.). Its scavenging effect on free radical and active oxygen. *Journal of American Oil Chemist's Society Journal of American Oil Chemist's Society*, **75**, 455- 461.
- Pokorny J., 1991.** Natural antioxidants for food use. *Trends in food science and technology*, **9**, 223-227.
- Pradeau D., Cohen Y., 1992.** L'analyse pratique du médicament. Ed. *médicales internationales*, 418-428.
- Pryor W.A., Strickland T., Church D.F., 1988.** Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulfate micelle solutions. *J. Journal of American Oil Chemist's Society* , **110**, 2224.
- Pszczola D.E., 2001.** Antioxidants: from preserving food quality to quality of life. *Food Technology*, **55**, 51-59.
- Quezel P. et Santa S., 1963.** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris.
- Rasooli I. and Mirmostafa, A., 2003.** Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 2200–2205.
- Richard H., Benjlali B., Bauquour N., Baritoux O., 1985.** Etude de diverses huiles essentielles de thym du Maroc. *Lebensm-Wiss U-Technol*.
- Richard F., 1992.** Manuel des corps gras, Paris, Ed. Lavoisier, Tec. Et Doc., 1228-1242.
- Richard H., 1992.** Epices et aromates. Ed. Technique & Documentation - Lavoisier, Paris, 339.
- Roeding-Penman A. et Gordon M . H., 1998.** Antioxidant properties of Myricetin and Quercetin in oil and emulsions. *Journal of American Oil Chemist's Society*, **75**, 169-180.
- Rolland Y., 2004.** Antioxydants naturels végétaux. *OCL*, **11**, 419-424.
- Rouessac F., Rouessac A., 1995.** Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes. Ed. Masson, Paris.

- Ruberto G., Biondi D., Cianci P., Geraci C., 1993.** Antimicrobial Activity and chemical composition of Essential oils from Sicilian Aromatic Plants. *Flavour and Fragrance Journal*, **8**, 331-337.
- Ruberto G., Baratta M.T., Sari M. et Kaabeche M., 2002.** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*, **17**, 251-254.
- Ruch R.T., chung R.U., Kalauning J.E., 1984.** Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. *Methodes enzymology*, **105**, 198- 209.
- Ruiz A., Cañada M.J.A. and Lendl B., 2001.** A rapid method for peroxide value determination in edible oils based on flow analysis with Fourier transform infrared spectroscopic detection. *The Analyst*, **126**, 242-246.
- Sagdic O. and Ozcan M., 2003.** Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, **14**, 141–143
- Sarbach R., 1962.** Contribution à l'étude de la désinfection chimique des atmospheres. *Faculté de Pharmacie, Université de Rennes*, 181.
- Sari M., Biondi D.M., Kaâbeche M., Mandalari G., D'Arrigo M., Bisignano G., Saija A., Daquino C. and Ruberto G., 2006.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*, **21**, 890–898.
- Schwarz K. et Ternes W., 1992.** Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, **195**, 99-103.
- Sergent O., Morel I., Cogrel P., Chevanne M., Beaugendre M., Cillard P. and Cillard J., 1993.** Ultraviolet and infrared spectroscopy for microdetermination of oxidized and unoxidized fatty acyl esters in cells. *Analytical Biochemistry*, **211**, 219-223.
- Shantha N.C. and Decker E.A., 1994.** Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, **77**, 421-424.
- Shapiro S. and Guggenheim B., 1995.** The action of thymol on oral bacteria. *Oral Microbiology Immunology*, **10**, 241–246.
- Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., Nakamura T., 1992.** Antioxidative properties of xanthan on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 945- 948.
- Sikkema J., De Bont J.A.M. et Poolman B., 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The journal of biological chemistry*, **11**, 8022-8028.
- Sims R., Fioritti J., 1980.** Antioxidants as stabilizers for fats, oils and lipids containing foods. In Furia T. (Ed.), *Hand Book of food additives*, USA, 13-56.
- Singh G., Marimuthu P., De Heluani C.S. et Catalan Cesar A. N., 2006.** Antioxidant and Biocidal Activities of *Carum nigrum* (Seed) Essential Oil, Oleoresin, and Their Selected Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , **54**, 174# -181.

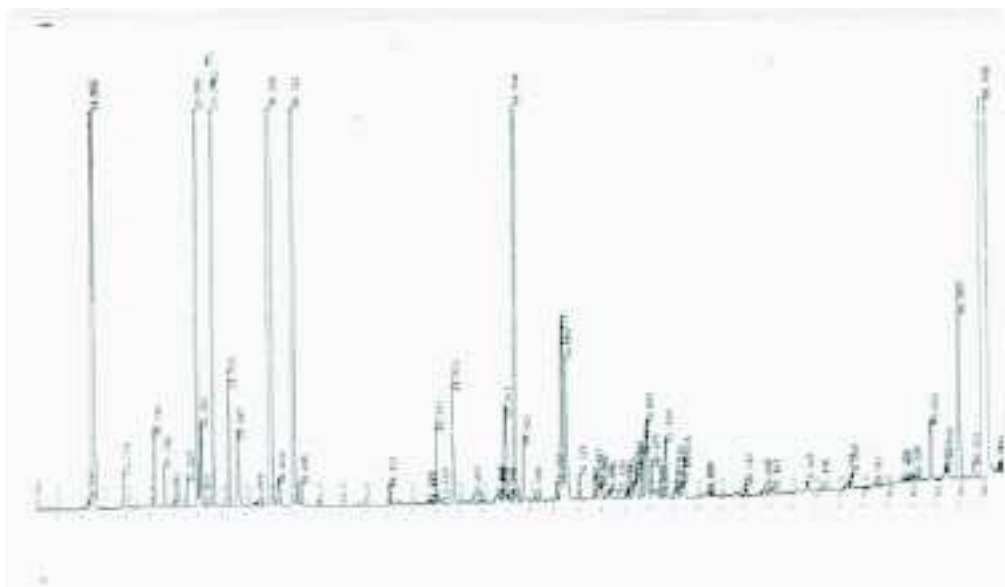
- Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., and Arsenakis M., 1996.** Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils. *Journal of Food Chemistry*, **44**, 1202-1205.
- Skandamis P.N. and Nychas G.J., 2001.** Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, 1011 – 1022.
- Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A.R., Simoncic M., and Knez Z., 2005.** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **89**, 191–198.
- Skoog D.A., Holler F.J. et Nieman T.A., 2003.** Principes d'analyse instrumentale. 1<sup>ère</sup> édition, Ed. De Boeck Université, 945 .
- Smith M. D. et Navilliat P.L., 1997.** A new protocol for antimicrobial testing of oils. *Journal of Microbiological Methods*, **28**, 21-24.
- Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L., 1998.** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, **26**, 118–22.
- Sokmen A., Gulluce M., Akpulat H.A., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M., Sahin F., 2004.** The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, **15**, 627–634.
- Stahl-Biskup E., 1991.** The chemical composition of *Thymus* oils: A review of the literature 1960-1989. *Journal of Essential Oil Research*, 61-82.
- Stahl-Biskup E., 2002.** Thyme: The genus *Thymus*. Ed. Taylor & Francis, London.
- Tanaka M., Kuel C.W., Nagashima Y., Tagashi T., 1988.** Application of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1409-1414.
- Tassou C.C., Drosinos E.H., Nychas G.J.E., 1995.** Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 jC and 10 jC. *Journal of Applied Bacteriology*, **78**, 593 – 600.
- Tassou C.C. and Nychas G.J.E., 1995.** Antimicrobial activity of the essential oil of Mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on gram-positive and gram-negative bacteria in broth and model food systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **36**, 411–20.
- Tepe B., Sokmen M., Akpulat A. et Sokmen A., 2005.** In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey. *Food chemistry*, **92**, 89-92.
- Tepe B., Sokmen M., Akpulat A. et Sokmen A., 2006.** Screening of the antioxidant potential of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*, **95**, 200-204.
- Tomaino A., Cimino F., Zimbalatti V., Venuti V., Sulfaro V., De Pasquale A., Saija A., 2005.** Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*, **89**, 549–554.
- Thompson D.P., 1996.** Inhibition of growth of *mycotoxigenic Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *Journal of Food Protection*, **59**, 412-415.

- Ting E.W.T., Deibel K.E., 1992.** Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to spices at two temperatures. *Journal of Food Safety*, **12**, 129 – 137.
- Tranchant J., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson, Paris.
- Tsigarida E., Skandamis P. and Nychas G.J.E., 2000.** Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere-packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, **89**, 901–909.
- Ultee A., Gorris L. M. G. and Smid E.J., 1998.** Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, **85**:211-218.
- Ultee A., Kets E. P. W. and Smid E.J., 1999.** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4606-4610
- Ultee A., Slump R.A., Steging G. and Smid E.J., 2000.** Antimicrobial activity of carvacrol on rice. *Journal of Food Protection*, **63**, 620-624.
- Ultee A., Kets E.P.W., Alberda M, Hoekstra F.A. and Smid E.J., 2000.** Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*, **174**, 233-238.
- Valero M., Salmeron M.C., 2003.** Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International. *Journal of Food Microbiology*, **85**, 73–81.
- Van Kuijk F.J., Thomas D.W., Stephens R.J. and Dratz E.A., 1990.** Gas chromatography mass spectrometry assays for lipid peroxides. *Methods in Enzymology*, **186**, 388-398.
- Vardar-Unlu G., Candan F., Sokmen A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen M., Donmez E. and Tepe B., 2003.** Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 63–67.
- Vareltzis K., Koufidis D., Gavriilidou E., Papavergou E. and Vasiliadou S., 1997.** Effectiveness of a natural Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. *Z Lebensm Unters Forsch A*, **205**, 93-96.
- Vermin G., 1982.** Aromes alimentaires et développements récents. Ed. APRIA.
- Viaud H., 1993.** Cité par Michel Van hove. Aromathérapie. [www.naturehelps.com/France/Viaud2.htm](http://www.naturehelps.com/France/Viaud2.htm).
- Vokou D., Kokkini S. and Bessiere J.M., 1988.** *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece: Distribution, volatile oil yield, and composition. *Economy Botanic*, **42**, 407-412.
- Vokou D., Kokkini S. and Bessiere J.M., 1993.** Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochem. Systematics and Ecology*, **21**, 287-295.

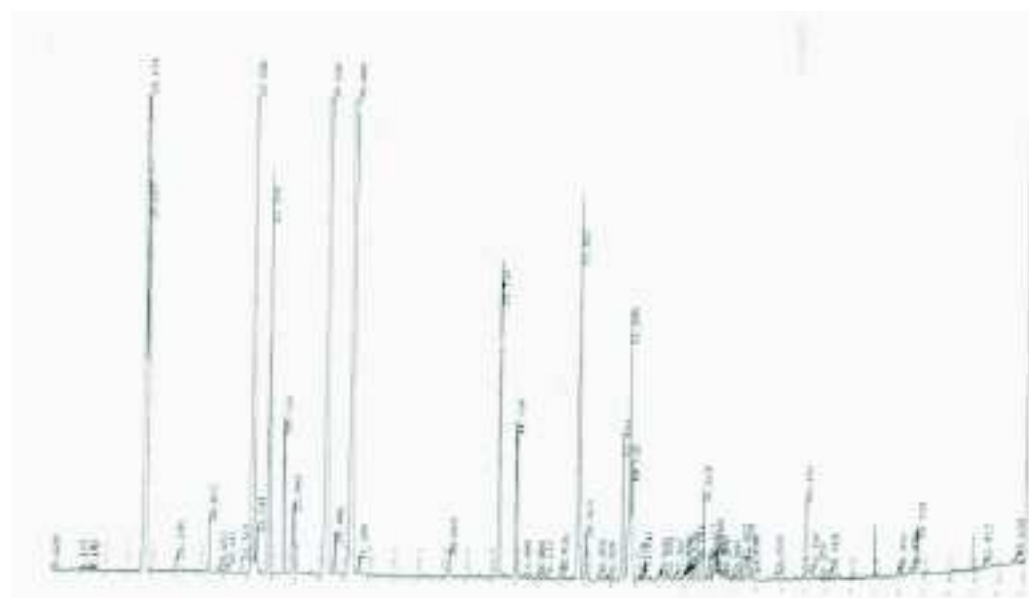


- 
- Walsh S. E., Maillard J.Y. Russell A.D ., Catrenich C.E ., Charbonneau D.L ., Bartolo R.G ., 2003.** Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and Gram negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, **94**, 240-247.
- Wan J., Wilcock A., Coventry M.J., 1998.** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 152 – 158.
- Warner K., Eskin N.A.M., 1995.** Methods of assess quality and stability of oils and fat-containing foods. AOCS press, Champaign.
- Wolff J.P., 1968.** Manuel d'analyse des corps gras. Ed. Azoulay, Paris.
- Wolff S.P., 1994.** Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in Enzymology*, **233**, 182-189.
- Yang G.C., Qiang W., Morehouse K.M., Rosenthal I., Ku Y. and Yurawecz P., 1991.** Determination of hydroperoxides in edible oils by electron spin resonance, thiobarbituric acid assay, and liquid chromatography-chemiluminescence techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 896-898.
- Yeagle P., 1989.** Lipid regulation of cellu membrane structure and function. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **3**, 1833-1842.
- Zaika L.L., 1988.** Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its Determination. *Journal of Food Safety*, **9**, 97-118.
- Zarnovican M.H., 2004.** Le contrôle des bactéries alimentaires par les huiles essentielles de basilic et de thym. *Bio clips*, **12**. <http://www.foodnavigator.com/news/news> .

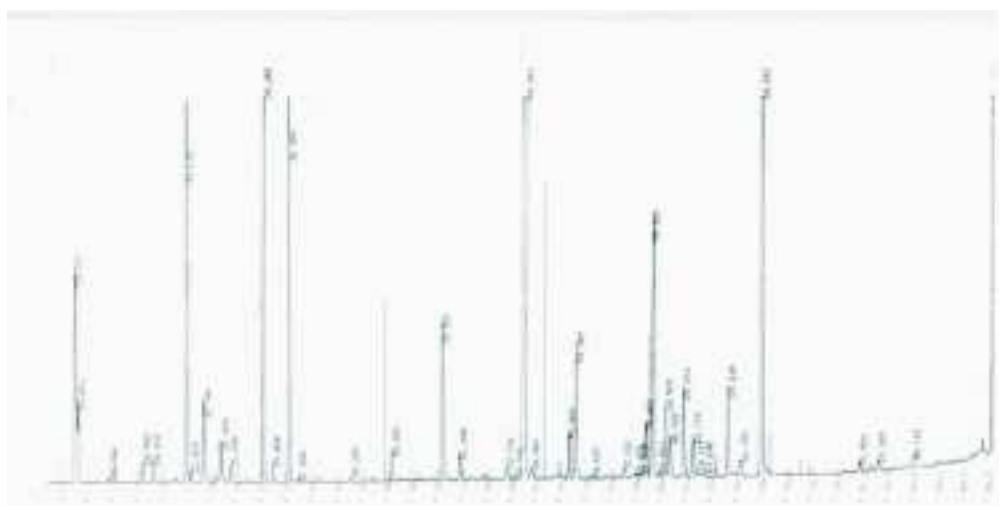
## Annexes



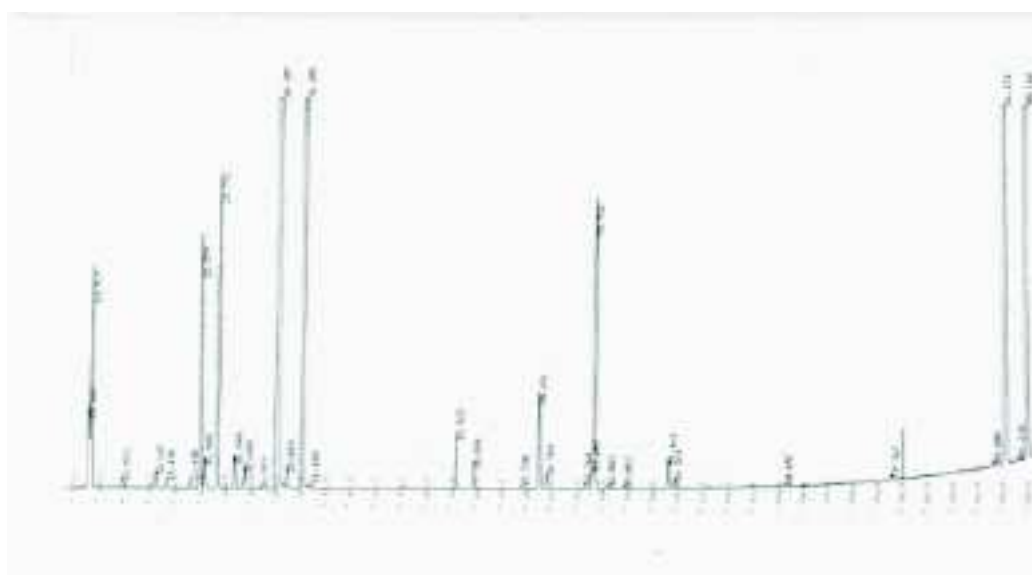
*Figure 1 : Chromatogramme de l'HE de Thymus pallescens*



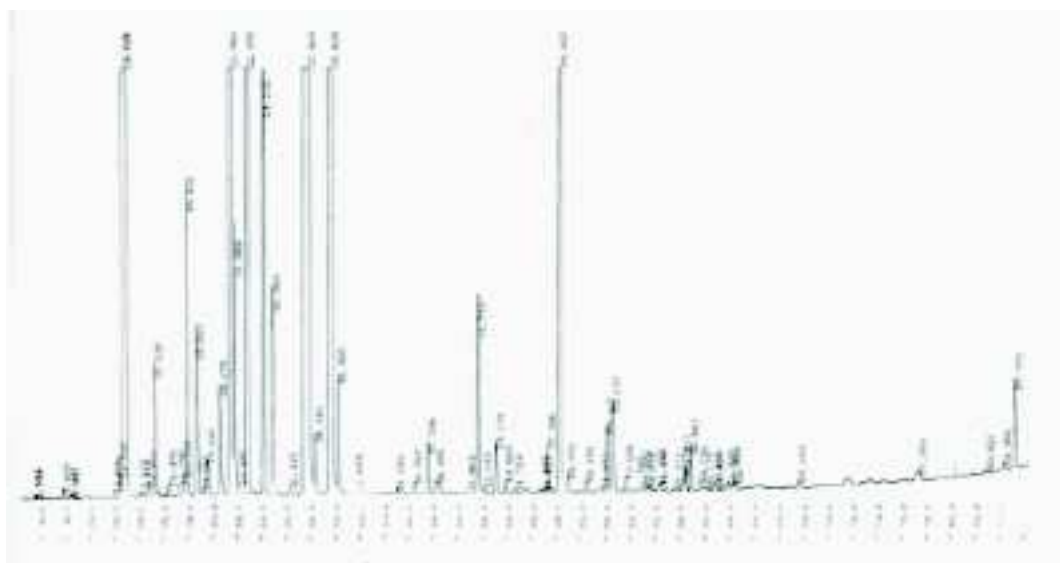
*Figure 2 : Chromatogramme de l'HE de Thymus munbyanus*



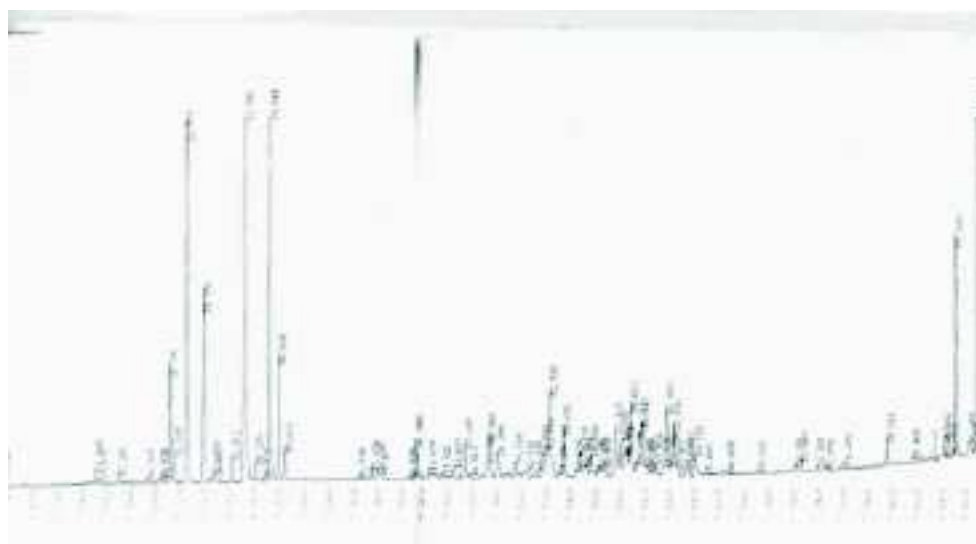
**Figure 3 :** Chromatogramme de l'HE de *Thymus dreatensis*



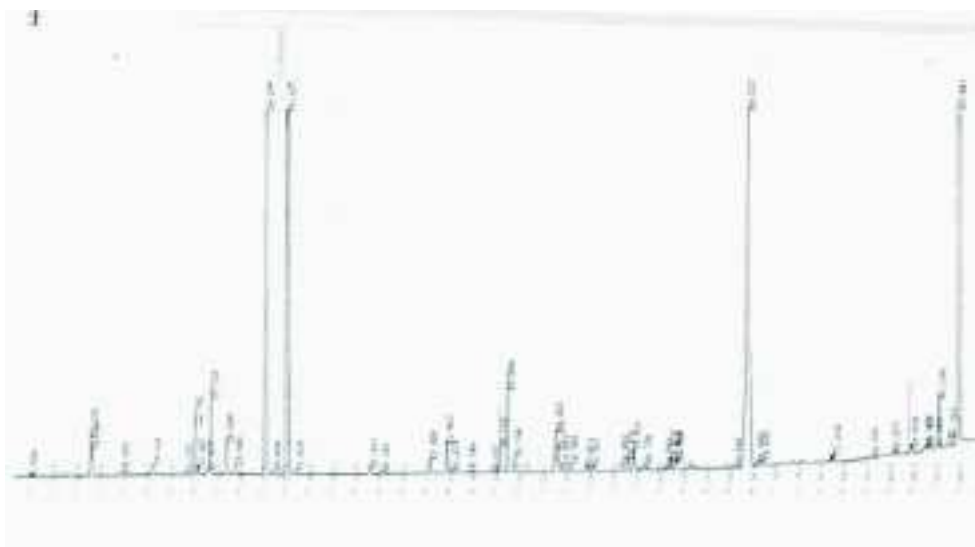
**Figure 4 :** Chromatogramme de l'HE d'*Origanum floribundum*



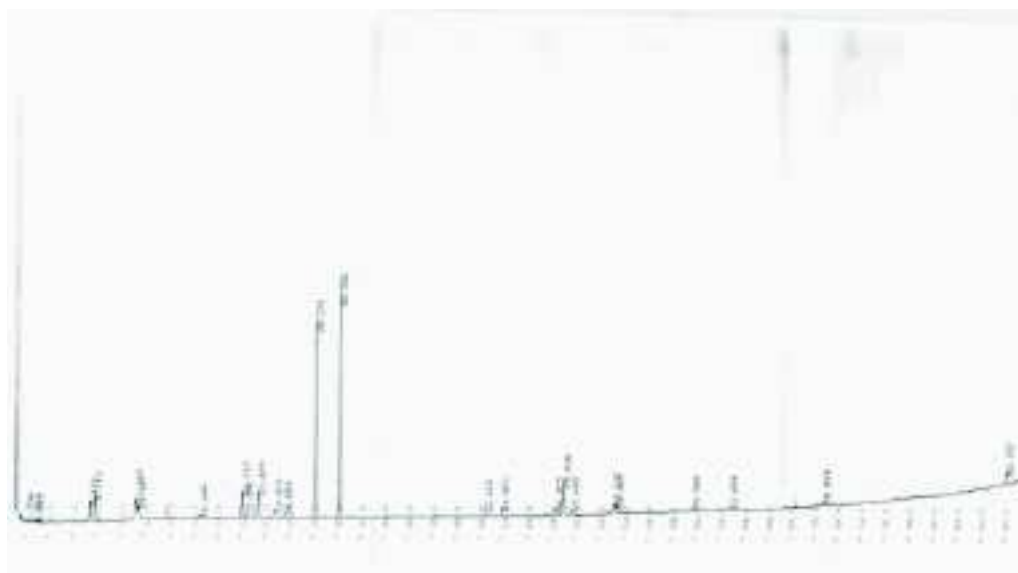
**Figure 5** : Chromatogramme de la F<sub>1</sub> de l'HE de *Thymus pallescens*



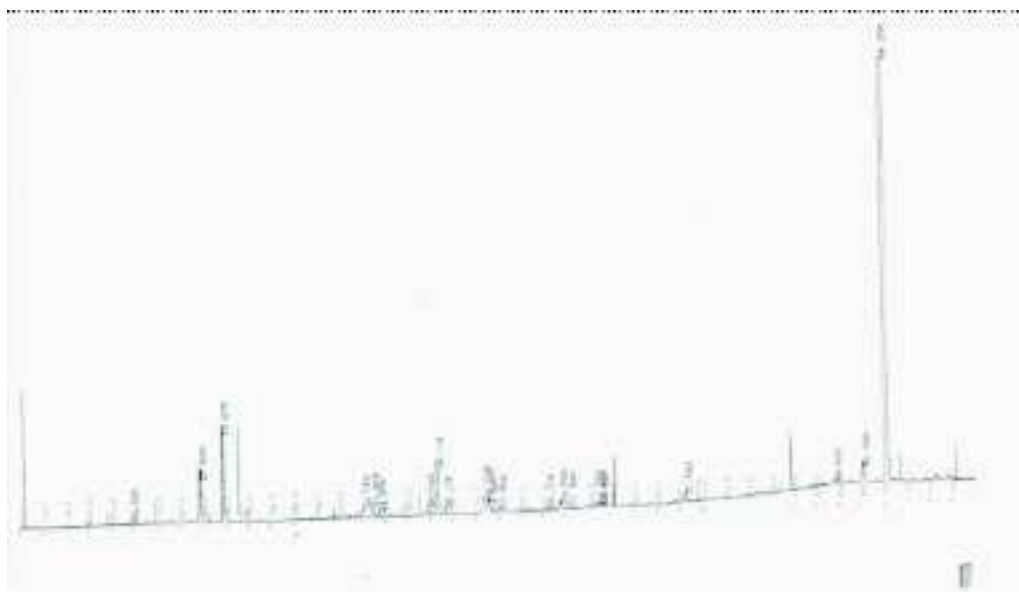
**Figure 6** : Chromatogramme de la F<sub>2</sub> de l'HE de *Thymus pallescens*



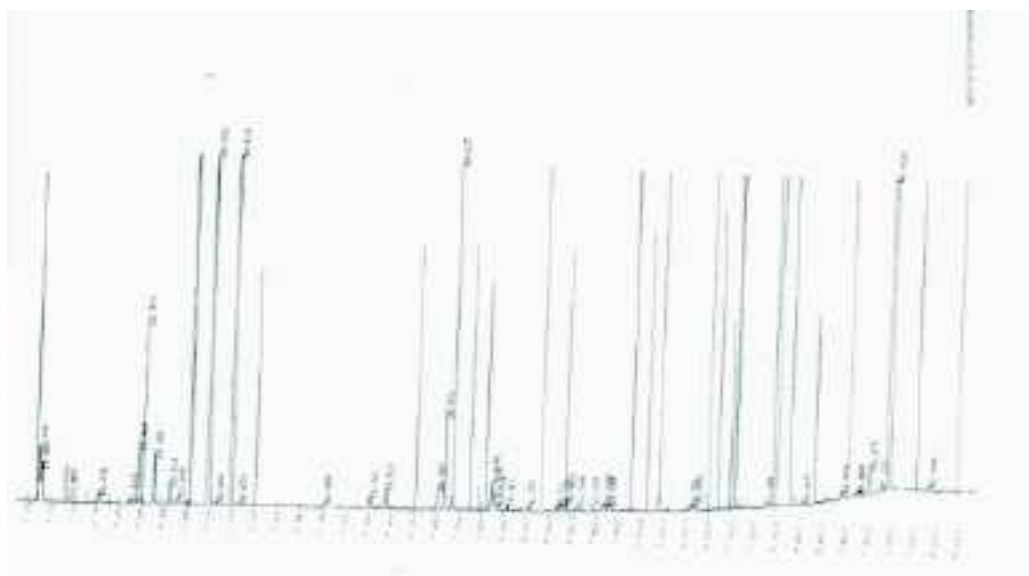
**Figure 7 :** Chromatogramme de l'extrait par l'hexane de *Thymus pallescens*



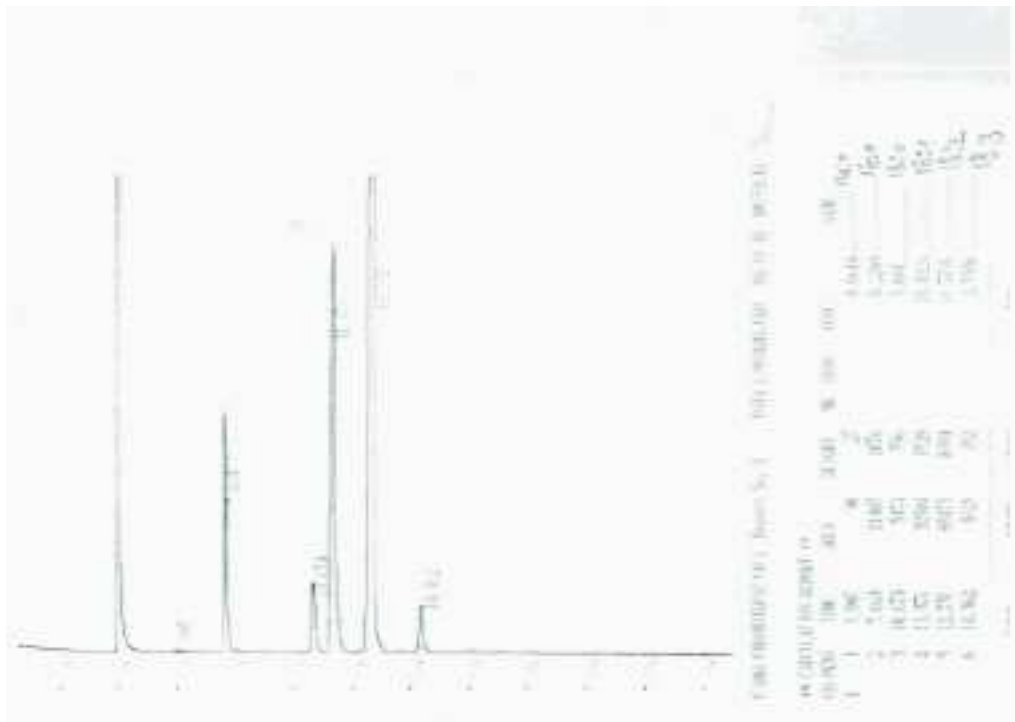
**Figure 8 :** Chromatogramme de l'extrait par l'éther diéthylique de *Thymus pallescens*



**Figure 9:** Chromatogramme de l'extrait par l'éthanol de *Thymus pallescens*



**Figure 9:** Chromatogramme de l'extrait par le dichlorométhane de *Thymus pallescens*



**Figure 10** : Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras de l'huile de tournesol