

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques

Département de biochimie et microbiologie



Option Alimentation Humaine et Qualité des Produits

Mémoire de fin d'études



Thème :

Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de laurier noble et du thym à linalol testées individuellement et en combinaison.

Réalisé par :

ALILI Zahia

TANTAR Omar

Dirigé par :

Mr AMROUCHE Tahar

Soutenu devant le jury :

Président :

M^{md} BENAHMED DJILALI Adiba Maitre de conférences classe A UMMTO

Examineurs :

M^r BENGANA Mohamed Maitre de conférences classe B UMMTO

M^r ARKOUB Mouloud Maitre-assistant UMMTO

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur Mr Amrouche T., maître de conférences à l'UMMTO, pour ses conseils judicieux, son jugement critique et son appui tout au long de cette étude. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir ont énormément marqué.

Nous remercions vivement les membres de ce jury :

Madame BENAHMED DJILALI Adiba, Maître de conférences à l'UMMTO, Nous sommes très honorés que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire, Merci pour l'effort et le temps consacré à évaluer notre travail.

Monsieur BENGANA Mohamed, Maître de conférences à l'UMMTO, merci d'avoir accepté de faire partie du jury, et pour le temps consacré à évaluer notre travail.

Monsieur ARKOUB Mouloud, Maître-assistant à l'UMMTO, Merci d'avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire, et pour l'intérêt que vous portez à notre travail.

Nous remercions également tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Merci à nos familles qui nous ont soutenues et aidées à accomplir ce travail.

Sommaire

Introduction générale	01
------------------------------------	----

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles

1. Historique.....	03
2. Définition des huiles essentielles.....	04
3. Description des plantes productrices des huiles essentielles.....	04
4. Composition des huiles essentielles.....	06
4-1-Composés terpéniques	08
4-2-Terpénoïdes.....	08
4-3-Composés aromatiques dérivés du phénylpropane	08
4-4-Autres constituants des huiles essentielles	08
4-5-Composition des huiles essentielles du laurier et du thym.....	08
5. Biosynthèse et fonctions des huiles essentielles.....	10
6. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles.....	13
7-1-Caractères physiques.....	13
7-1-1-Indice de réfraction à 20 °C.....	13
7-1-2-Densité relative à 20°C	13
7-1-3-Pouvoir rotatoire.....	13
7-1-4-Solubilité.....	14
7-2-Caractères chimiques.....	14
7-2-1-Indice d'acide	14
7-2-2-Indice de peroxyde.....	14
7. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	15
-Distillation à la vapeur d'eau.....	15
-Distillation à l'eau	15
-Expression des épicarpes.....	16
-Distillation sèche	16
-Extraction par solvants volatils	17
-Autres procédé	17
8. Conservation et la stabilité des huiles essentielles.....	17
9. Toxicité des huiles essentielles.....	18

Chapitre II : Activité antimicrobienne des huiles essentielles

1. Activité antimicrobienne	
1-1-Activité antibactérienne	19
1-2-Activité antifongique.....	19
1-3-Activité antivirale.....	20
1-4-Activité antiparasitaire.....	21
2. Autres activités biologiques 0	
2-1-Activité antioxydante	22
2-2-Activité anti-inflammatoire	22
2-3-Activité anticancéreuse	23
2-4-Activité insecticide et répulsive.....	23
3. Mécanisme d'action des huiles essentielles sur les bactéries.....	24
4. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	25
5. Etude de la combinaison entre les huiles essentielles.....	26
6. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	27

Chapitre III : Domaines d'applications des huiles essentielles

1. Agroalimentaire.....	29
2. Cosmétique.....	29
3. Pharmaceutique.....	30
4. Aromathérapie.....	31

Partie matériel et méthodes

I. Protocole expérimental	33
II. Les agents antimicrobiens testés.....	34
II.1. L'huile essentielle de thym	34
II.2. L'huile essentielle de laurier.....	34
III. Matériel biologique	
III.1. Identification des souches microbiennes.....	36
III.1.1. Vérification de la pureté des souches.....	36
III.1.2. Conservation des souches.....	36
III.1.3. Observation macroscopique.....	36
III.1.4. Observation microscopique.....	36
III.2. Préparation de l'inoculum microbien.....	36
IV. Evaluation qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne.	
IV.1. Test in vitro	37
IV.2. Protocole expérimental	37
IV.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)	38
IV.3.1. Détermination de la CMI.....	38
IV.3.2. Préparation des dilutions.....	38
IV.3.2.1. Dilution des huiles essentielles	38
IV.3.2.2. Préparation des solutions d'acide citrique.....	38
IV.3.2. Détermination de la CMB	38
V. Combinaisons d'agents antimicrobiens.....	39

Partie résultats et discussion :

I. Vérification de la pureté des souches.....	41
I.1. Observation microscopique à l'état frais	
II. Coloration de Gram.....	42
II. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	42
II.1. Résultats des témoins	42
II.2. Effet antibactérien des agents testés	
II.2.1. Effet de l'huile essentielle de thym à linalol sur <i>E. coli</i>	43
II.2.2. Effet de l'huile essentielle de Laurier noble sur <i>Escherichia-Coli</i>	45
II.2.3. Effet de l'acide citrique sur <i>Escherichia-Coli</i>	46
II.3. Détermination des valeurs des CMI (concentrations minimales inhibitrices).....	47
II.4. Détermination des CMB (concentrations minimales bactéricides) obtenues pour les différents agents antimicrobiens testés sur <i>E. coli</i>	47
III. Combinaisons d'agents antimicrobiens.....	48
III.1. Effet combiné de l'huile essentielle de thym à linalol et l'acide citrique.....	48
III.2. Effet combiné de l'huile essentielle de laurier noble et de l'acide citrique.....	52
III.3. Combinaison entre deux huiles essentielles.....	55
Conclusion et perspectives.....	60
Références bibliographiques	61
Annexe.....	72

LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES ET ANNEXES :

FIGURES :

Figure 1 : Localisation de cellule sécrétrice dans le mesophylle des feuilles de laurier (vu sous microscope photonique G×40).....	05
Figure 2 : Une unité d'isoprène.....	07
Figure 3 : Structure chimique de constituants sélectionnés d'huiles essentielles.....	10
Figure 4 : Les grandes voies métaboliques présidant a la production des molécules aromatiques.....	12
Figure 5 : Schéma simplifier du processus de l'extraction par entrainement a la vapeur d'eau.....	15
Figure 6 : Schéma de l'appareillage d'extraction des huiles essentielles.....	16
Figure 7 : Localisation et mécanisme d'action des composants d'huiles essentielles sur les bactéries.	24
Figure 8 : Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri.....	27
Figure 9 : Illustration de la méthode des microatmosphères.....	28
Figure 10 : Photos montrant les souches bactériennes après coloration de Gram, observées au microscope optique (G×1000 à immersion).....	42
Figure 11 : Effet du DMSO et de l'antibiotique sur Escherichia Coli.....	43
Figure 12 Photos montrant l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Thym sur E-Coli.	44
Figure 13 : Photos montrant l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Laurier sur E-Coli.....	45
Figure 14 : Photos montrant l'activité antimicrobienne de l'acide citrique sur E-Coli.....	46
Figure 15 : Photos montrant les CMI des agents antimicrobiens testés sur E Coli.....	48

Figure 16 : Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison de l'huile essentielle de Thym avec l'acide citrique.....	51
Figure 17 : Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison de l'huile essentielle de Laurier avec l'acide citrique.....	54
Figure 18 : Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison de l'huile essentielle de Thym avec l'huile essentielle de Laurier.....	5

TABLEAUX :

Tableau I : Les familles botaniques les plus courantes pour la production des huiles essentielles.....	14
Tableau II : Analyse chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> par CPG couplée à une SM.	17
Tableau III : Composés majoritaires de l'huile essentielle de laurier ' <i>laurus nobilis</i> ' par CPG couplée à une SM.	17
Tableau IV : Descriptions des différents microorganismes utilisés dans cette étude.....	35
Tableau V : Les dilutions des huiles essentielles effectuées dans le DMSO.....	38
Tableau VI : Les dilutions d'acide citrique préparées.	38
Tableau VII : Résultats de l'observation microscopiques à l'état frais et après coloration au bleu de méthylène des souches microbiennes étudiées.....	41
Tableau VIII : Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la dose de l'huile de Thym utilisée	44
Tableau IX : Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la dose de l'huile de Laurier utilisée	45
Tableau X : Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la dose de l'acide citrique utilisée.....	46
Tableau XI : Valeurs des CMI obtenues pour chaque agent antimicrobien testé sur E Coli..	47
Tableau XII : Résultats de combinaison de l'HE de Thym et de l'acide citrique sur E.coli..	49
Tableau XIII : Résultats de combinaison de l'HE de Laurier et de l'acide citrique sur E.coli.	52

Tableau XIV : Résultats de combinaison de l'huile essentielle du Thym avec l'huile essentielle de Laurier sur E.coli..... 56

Annexe :

Annexe I : composition chimique par chromatographie phase gazeuse de huile essentielle de laurier noble (ANONYME-2, 2017).

Annexe II : certificat d'analyse d'huile essentielle de thym effectuer par chromatographie phase gazeuse (ANONYME-1. 2017).

Annexe III : Observation à l'état frais.

Annexe IV : Coloration au bleu de méthylène.

Annexe V : Coloration de Gram (coloration différentielle).

Résumé

L'étude que nous avons effectuée *in vitro* avait pour objectif d'évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Thym à linalol et de Laurier noble et celle de l'acide citrique, séparément et en combinaison deux à deux.

Les résultats obtenus ont montrés que l'huile essentielle de Thym avait un pouvoir antibactérien et antifongique de loin supérieur à celui des autres agents testés.

Les résultats de combinaisons ont montrés un même effet inhibiteur à des concentrations sub-inhibitrices réduites des agents combinés, ceci indique alors une interaction positive entre les agents testés.

De ce fait, nos résultats laissent à suggérer une possible application d'agents antimicrobiens naturels dans le domaine alimentaire, ou autres domaines.

Summary

The objective of our study *in vitro* was to evaluate the antimicrobial activity of the essential oils of thyme linalool, noble Bay-tree and citric acid, separately and in combination in pairs.

The results obtained showed that the essential oil of thyme had an antibacterial and antifungal power superior to other tested agents.

The results of combinations showed the same inhibitory effect at reduced sub-inhibitory concentrations of the combined agents, indicating a positive interaction between the agents tested.

As a result, our results suggest a possible application of natural antimicrobial agents in food, or other fields.

Introduction générale :

De nos jours, pour subvenir au rythme des productions, les agents synthétiques chimiques sont fréquemment utilisés dans les domaines agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Malheureusement, certains composés auraient été utilisés même avant d'en avoir la certitude de leurs innocuités. Ceci suscite donc de l'inquiétude et de la méfiance chez le consommateur, d'où alors le grand débat médiatique actuel sur les molécules synthétiques.

Cet état de fait se justifie par les risques engendrés par l'usage des molécules synthétiques sur la santé du consommateur et leur impact négatif sur l'environnement. En effet, les chercheurs découvrent de plus en plus d'effets négatifs attribués aux produits chimiques longtemps considérés comme sains. Par exemple,

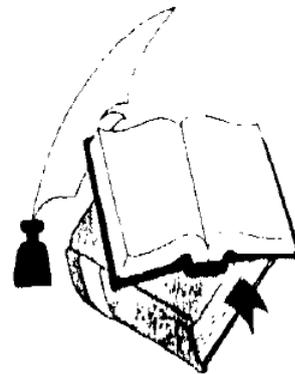
De ce fait, la recherche de produits naturels suscite un intérêt continuellement grandissant, car les industriels se retrouvent face à un marché développant des exigences vis-à-vis de ces produits. Cette orientation inspire à la communauté scientifique d'élargir leurs recherches afin d'adapter leurs utilisations dans divers domaines principalement agroalimentaires.

Les métabolites végétaux constituent une source alternative à de nombreux produits chimiques synthétiques. À leur tête les huiles essentielles, qui par leurs multitudes propriétés ouvrent le champ pour cette orientation vers la nature. Actuellement, près de 3000 huiles essentielles sont décrites, parmi lesquelles environ 300 présentent une importance commerciale dans le cadre des applications pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, agronomiques ou dans le domaine de la parfumerie (BAKKALI et al. 2008).

La principale fonction ayant permis l'élargissement des applications des huiles essentielles est leur activité antimicrobienne. Récemment, elle fait l'objet de plusieurs recherches, elles montrent leur efficacité sur plusieurs souches microbiennes pathogènes ou de détérioration des produits alimentaires. Utilisées individuellement ou en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens, elles offrent des perspectives prometteuses dans divers domaines d'application..

L'objectif de ce modeste travail est de déterminer et comparer l'activité antimicrobienne des huiles de laurier et du thym, seul et en combinaison avec l'acide citrique, en les testant sur plusieurs souches microbiennes de références.

Synthèse bibliographique



Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles

1-Historique :

Il est connu depuis l'Antiquité que les huiles essentielles présentent une activité antiseptique non négligeable (KALOUSTIAN *et al*, 2008), car déjà avant 40 000 ans av J.-C., les aborigènes australiens les utilisaient pour le traitement des infections par fumigation ou cataplasme, (CONNER, 1993).

Il y a plus de 7000 ans en Inde, les « eaux aromatiques » étaient déjà largement employées dans le traitement des troubles de la santé. Le continent indien est le berceau du bien des plantes aromatiques, dont le basilic, qui était sacré (*Ocimum sanctum*). Elles occupaient une large place au cours des sacrifices religieux, et autant que pour soigner le corps et l'esprit (JOUAULT, 2012).

En Chine, le dieu-empereur Shen Nung qui règne sur la Chine vers 2 800 avant J.-C. donne aux hommes la science de la botanique et rédige le *Pen ts'ao*, dans lequel il livre de nombreuses recettes d'herbes médicinales (GROSJEAN, 2015).

En Inde, on trouve des indices de médecine traditionnelle datant de 1500 ans av J.-C, ou elle a passé de bouche à oreille de père en fils, pour plusieurs générations, jusqu'à ce qu'elle soit incluse dans les écritures saintes connue autant que la 'Vedas', beaucoup de plantes connues dans le folklore indien ont été mis en service par les égyptiens et les grecs après. En fin de compte, elles ont trouvé leur chemin vers la médecine populaire européenne aussi (YANIV, 2012).

Il est admis que c'est les arabes qui ont inventé, perfectionné et répandu la technique de la distillation à la vapeur d'eau (MELINDA WILSON,2010). Vers l'an 1000, Avicenne ' Abu Ali al Husayn ben'Abd Allah ibn Sina' (980-1037), médecin et philosophe, améliore la technique de la distillation et produit la première huile essentielle pure (LARDY, 2007), par la mise au point d'un alambic pour une distillation à la vapeur d'eau.

L'utilisation des huiles essentielles a connu un grand essor grâce notamment aux publications du Dr. Valnet dans les années soixante. Ce médecin chirurgien militaire français usait sur les blesses des mélanges aromatiques de sa confection et obtenait selon lui des résultats

supérieurs à ce qu'on pouvait espérer avec les méthodes en cours à cette période. (BUCKLE, 2015)

Depuis lors, de très nombreuses études ont été réalisées pour prouver l'intérêt thérapeutique et économique de ces substances, à présent intégrées à l'industrie agro-alimentaire, ainsi qu'à l'arsenal thérapeutique d'un nombre croissant de médicaments.

2-Définition :

La norme AFNOR NF T 75-006 apporte la définition de l'huile essentielle comme étant : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

L'AFSSPS: Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (2008), apporte une définition plus détaillée elle présente les huiles essentielles comme étant : « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».

Et selon la norme ISO 9235:2014, elle est définie comme « le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

3- Descriptions des plantes productrices des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des substances volatiles et aromatiques contenues dans des végétaux et extraites le plus souvent par entraînement à la vapeur ou par expression. Les huiles essentielles ne sont pas présentes dans toutes les plantes : parmi les 800 000 espèces végétales recensées, seules 10% sont capables de synthétiser une essence. Ces plantes sont dites « aromatiques » (DEGRYSE, 2008).

Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits (BURT, 2004). L'huile essentielle se trouve

dans des cellules sécrétrices spécifiques. Ce sont des structures histologiques spécialisées servant à leur synthèse et à leur stockage (figure 1). Ces cellules sécrétrices sont rarement à l'état isolé, mais le plus souvent regroupées dans des poches (Myrtacées, Rutacées), dans des canaux sécréteurs (Apiécées, Composées) ou dans des poils sécréteurs (Lamiacées). Ces cellules sont le plus souvent à la périphérie des organes extérieurs de la plante (KALOUSTIAN et HADJI-MINAGLOU, 2012).

Les plantes aromatiques comportent trois principales catégories d'appareils sécréteurs : les poils glandulaires épidermiques, les poches et les canaux glandulaires schizogènes et schizolysigènes. Ce sont des cavités situées dans les parenchymes des feuilles. Des tiges et des fruits, chez certaines espèces. Les structures glandulaires peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux, végétatifs et reproducteurs. Rares sont les plantes chez qui ces structures sont présentes dans un seul organe. La plupart en sont pourvues dans toutes leurs parties (RAYMOND, 2005).



Figure 1 : Glande sécrétrice avec cuticule dans la face inférieure de la feuille d'*Origanum vulgare* (SVOBODA et al, 2000).

La teneur des plantes en huile essentielle est faible de l'ordre de 1 à 3 % à l'exception du clou de girofle de (14 à 19 %), du macis (10 à 13 %), de la noix de muscade (8 à 9 %), de la cardamome (4 à 10 %). Les familles botaniques productrices d'huiles essentielles les plus courantes sont d'après KALOUSTIAN (2012) rapportées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Les familles botaniques les plus courantes pour la production des huiles essentielles

Famille botanique :	Espèces :
Abiétacées	pins, sapins, épicéa, cèdres...
Apiécées	anis, fenouil, angéliques, coriandre...
Astéracées	camomille, absinthe...
Cupressacées	cyprès, genévrier...
Lamiacées	lavandes, thym, romarins, menthes, origans, marjolaines, sarriettes
Lauracées	cannelles, lauriers, ravensaras...
Myrtacées	Eucalyptus, giroflier, myrtes, tea tree, niaouli, cajepout...
Poacées	citronnelles, palmarosa, vétivers...
Rutacées	citron, citron vert, mandarine, pamplemousse, orange amère, orange douce, bergamote

4-Composition chimique des huiles essentielles :

Jusqu'à présent plus de 3000 constituants ont été isolés à partir des huiles essentielles, sa composition est en générale très complexe, Les méthodes analytiques modernes rendent possibles, la détection, l'identification et la quantification de plus d'une centaine de constituants pour une même huile essentielle (TEUSCHER *et al*, 2005).

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (SALZER, 1977), Plus de 60 molécules différentes peuvent entrer dans la composition chimique d'une huile essentielle. Les composés majoritaires peuvent représenter, à eux seuls, plus de 85% de l'huile alors que d'autres composés ne sont présents qu'à l'état de traces (SENATORE, 1996), les structures des classes chimique sont hétérogènes dépendant de la nature des molécules (figures 3).

Les composants actifs peuvent être devisés en quatre groupes selon leurs structures chimiques : terpènes, terpénoïdes, phénylpropènes, et autres. (HYLDGAARD *et al*, 2012).

4-1- Composés terpéniques :

Les terpènes forment structurellement et fonctionnellement différentes classes, ils sont formé de combinaisons d'une base multiple de 5 atome de carbone unis appelé isoprène (figure 2). Les principaux terpènes sont les monoterpènes (C10) et les sesquiterpènes (C15), mais les hemiterpènes (C5), diterpènes (C20), triterpènes (C30), et tetraterpènes (C40) existe aussi, et les terpènes contenant l'oxygène sont appelés des terpénoïdes (BAKKALI et *al*, 2008) La formule générale des terpènes est $[C_5H_8]_n$ (figure 3).

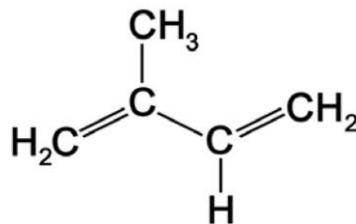


Figure 2 : Unité d'isoprène (JOUAULT, 2012)

Le point d'ébullition des terpènes augmente avec le nombre d'atomes de carbone dans la molécule ; les molécules de masse plus élevée sont moins volatiles, ainsi les huiles extraites par hydrodistillation ou par extraction a la vapeur contiennent plus de monoterpène (limonene) que de diterpenes (sclareol) ou encore moins de triterpene (KALOUSTIAN et HADJIMINAGLOU, 2013).

4-1-1-Monoterpènes :

Les composés monoterpéniques sont constitués de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est $C_{10}H_{16}$ (RAHAL, 2004). Les monterpènes peuvent être : monoterpènes acycliques (myrcène, ocimènes), ou monoterpènes monocycliques (α - et γ -terpinène, p-cymène) et des monoterpènes bicycliques (pinènes, Δ^3 -carène, camphène, sabinène).

4-1-2-Sesquiterpenes :

Sont formé de l'assemblage de trois unités d'isoprènes C_{15} de formule $(C_{15}H_{24})$. L'extension de la chaine augmente le nombre de cyclisation qui permet une grande variété de structures. La structure et la fonction des sesquiterpènes sont similaires à ceux des monoterpènes (BAKKALI et *al*, 2008).

4-2-Terpénoïdes :

Les terpénoïdes sont des terpènes qui ont subi des modifications biochimiques via des enzymes qui ajoutent des molécules d'oxygène et déplace ou supprime des groupements méthyl (figure 3). Les terpénoïdes peuvent être subdiviser en alcools, ester, aldéhydes, cétones, éthers, phénols, et des époxydes, exemple de terpenoïdes : thymol, carvacrol, linalol, linalyl acétate, citronellol, pipéritone, menthol, et géraniole (HYLDGAARD et *al*, 2012).

4-3-Composés aromatiques dérivés du phénylpropane :

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les monoterpènes et sesquiterpènes (figure 3). Citons l'acide cinnamique et l'aldéhyde cinnamique (HE de cannelle), l'eugénol (HE de girofle), l'anéthole et l'aldéhyde anisique (HE de badiane, d'anis, de fenouil), ainsi que le safrone (HE de saffron). Les lactones dérivées des acides cinnamiques, comme les coumarines, sont, pour la plupart, entraînés par la vapeur d'eau et ainsi présentes dans certaines huiles essentielles (ex. HE de céleri) (COUIC-MARINIER, 2013).

Les phénylpropanoïdes, ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques qui sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle. (GUINOISEAU, 2011).

4-4-Autres constituants des huiles essentielles :

Les huiles essentielles contiennent un nombre de différents produits de dégradation originaires d'acides gras insaturés, lactones, terpènes, glycosides, et des composants azotés et sulfurés, deux exemples de produits azotés et sulfurés qui ont une activité antimicrobienne sont l'allicine et les allylisocyanate (figure 3) (HYLDGAARD et *al*, 2012).

4-5-Composition des huiles essentielles de laurier et du thym :

La teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg dans le thym et sa composition fluctue selon le chémotype considéré (BRUNETON, 1999) et de l'ordre de 0.8 à 4 % ml/kg dans le laurier, ou elle peut atteindre 10% en automne (TEUSCHER, 2005). Les teneurs en composés majoritaires sont résumés dans le Tableau 2 et le Tableau 3..

Tableau 2 : Analyse chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* par CPG couplée à une SM (GUILLEN et MANZANOS, 1998 ; HUDAIB et *al*. 2002 ; BOUHDID et *al*, 2006).

Composés :	thymol	p-cymene	Û-terpinène	carvacrol	linalol
Teneurs en% :	(44,4 - 58,1)	(9,1 - 18,5)	(6,9 - 18,0)	(2,4 - 4,2)	(4,0 - 6,2)

Tableau 3 : Composés majoritaires de l'HE de laurier '*laurus noblis*' par CPG couplée à une SM (KILIC et al 2004 ; BELOUED, 2005 ; NURBAS et al, 2005 ; YALCIN et al, 2007)

Composé	1,8-cinéole	linalol	p-cymène	α-phellandrène	géraniol	eugénol
Teneur en%	(12 - 71)	(6 - 30)	(0 - 20)	(0 - 20)	(0 - 20)	(traces- 19)

Les autres constituants sont variables selon les périodes de la récolte les races chimiques et la période de récolte.

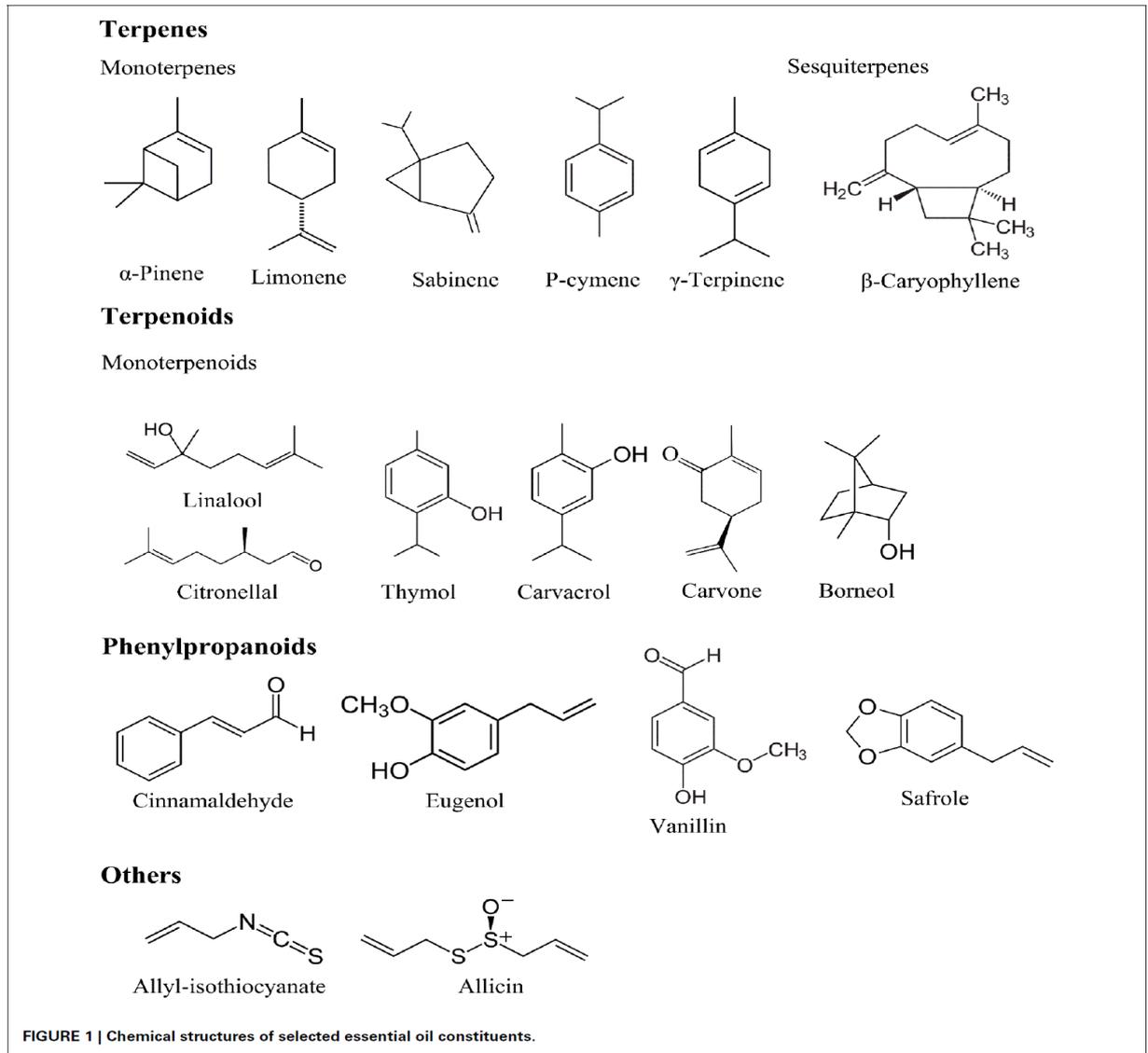


Figure 3 : Structure chimique de constituants sélectionnés d’huiles essentielles
(HYLDGAARD *et al.*, 2012)

5- Biosynthèse et fonction des huiles essentielles :

5-1-Biosynthèse :

La biosynthèse des composants des huiles essentielles (Figure 4) commence après synthèse d’hexose dans par photosynthèse, par la différenciation de deux types de synthèse : celles des composés terpéniques et celles des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

5-1-1-Composés terpéniques :

Les composés de la famille des terpènes ont des structures très variées, allant d'une simple chaîne linéaire d'hydrocarbonés jusqu'à des agencements complexes de cycles carbonés. Ces terpènes ont tous en commun d'être constitués de multiples sous unités d'isoprène (C_5H_8) (MANSARD, 2016).

Ces composés terpéniques, aussi nommés isoprénoïdes ou terpénoïdes sont issus de l'addition successive d'une unité en C_5 , le diphosphate d'isopentényle (IPP) sur une molécule *starter* : le diphosphate de diméthylalluyle (DMAPP) (BRUNETON, 1999).

A partir des unités de base que sont l'IPP et le DMPP, une condensation dite « tête-queue » produit les composés suivants :

- le géranyl diphosphate (GPP) : précurseurs des monoterpènes en C_{10} ,
- le farnésyl diphosphate (FPP) : précurseurs des sesquiterpènes en C_{15} ,
- le géranyl géranyl diphosphate (GGPP), précurseurs des diterpènes en C_{20} .

Les précurseurs subissent différentes transformations secondaires qui conduisent à différents types de noyaux qui eux-mêmes sont à l'origine des différentes classes de terpènes. (MANSARD, 2016)

5-1-2-Composés aromatiques :

La voie des phénylpropanoïdes commence par le métabolite fructose. Elle aboutit à un très grand nombre de substances aromatiques, via une série d'acides, dont l'acide shikimique et l'acide cinnamique. (RAYMOND, 2005). A partir de ces importants précurseurs se forment les dérivés aromatiques, notamment par des réactions d'élimination et de réarrangements intramoléculaires (BRUNETON, 1999).

De nombreuses autres synthèses sont à l'origine des composés des huiles essentielles on peut en citer certaines : la synthèse des phtalides, des hydrocarbures, des composés azotés et soufrés, ou des glucosides aromatiques (RAYMOND, 2005).

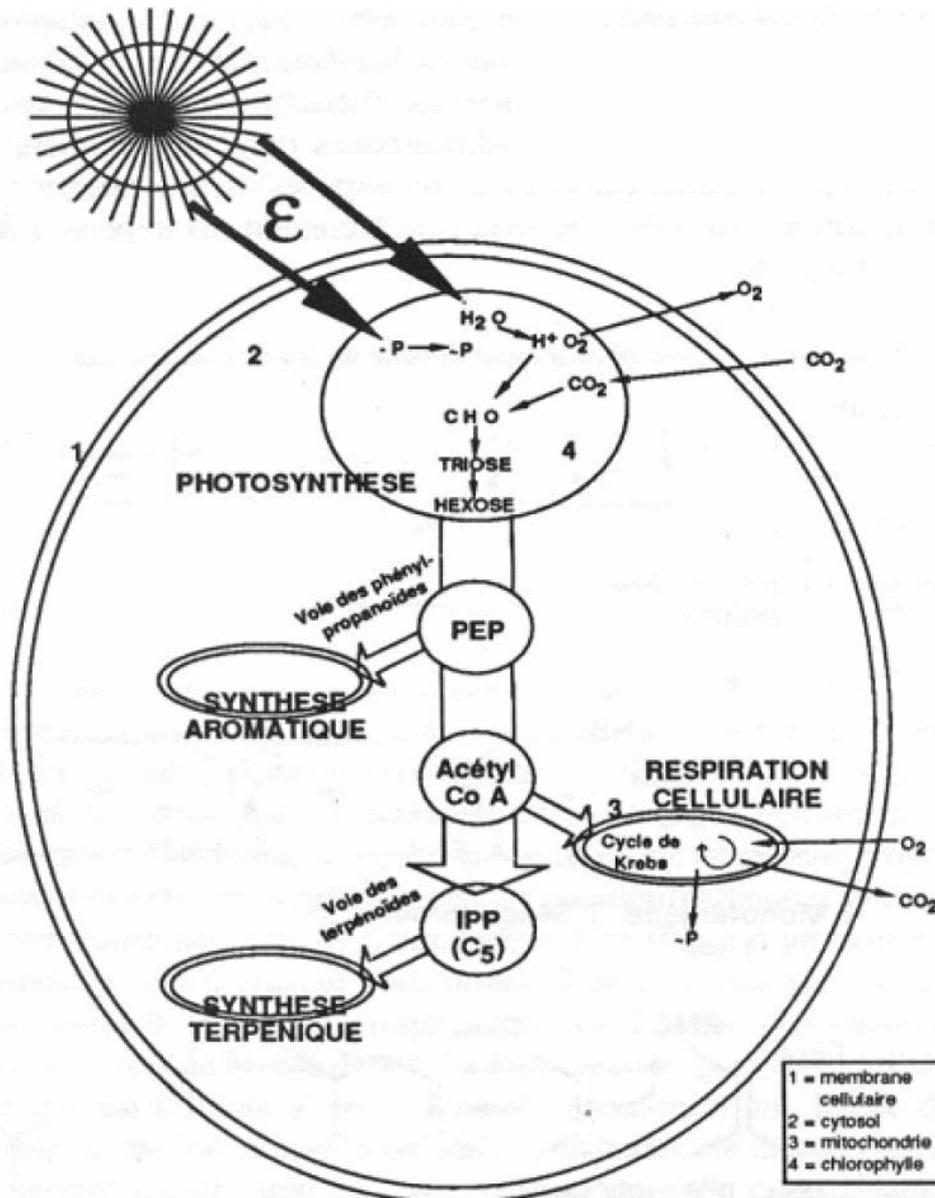


Figure 4 : Les grandes voies métaboliques présidant à la production des molécules aromatiques (RAYMOND, 2005)

5-2-Fonctions des huiles essentielles :

La fonction biologique des huiles essentielles demeure le plus souvent obscure, il est toutefois semblable qu'elles ont une fonction écologique (BRUNETON, 1999) , selon BURT ,2004, les huiles essentielles sont des métabolites secondaires synthétisés par les herbes autant que forme de protection contre les bactéries, virus, champignons, insectes, herbivores et le climat. D'autres parts ils peuvent attirer certains insectes pour promouvoir la dispersion du pollen et de graines.

6-Caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles :

6-1-Caractères physiques :

6-1-1-Détermination de l'indice de réfraction à 20 °C :

La réfraction est la déviation que subit un rayon lumineux en passant d'un milieu optique (par exemple l'air) à un autre (exemple liquide constituer d'une HE). Chaque huile essentielle possède son propre indice de réfraction « n ». La mesure est réalisée par un réfractomètre, le plus couramment utilisé étant le réfractomètre d'Abbe.

La détermination de l'indice de réfraction pour une huile essentielle permet seulement de vérifier si elle est conforme aux normes établies. En aucun cas, l'indice de réfraction ne pourrait servir pour l'identification d'une huile essentielle inconnue. (KALOUSTIAN et HADJI-MINAGLOU, 2013).

6-1-2-Densité relative à 20°C :

La densité des HE est très souvent inférieure à celle de l'eau, bien qu'il souffre plusieurs exceptions à cette règle : les cannelles (feuille [1,065] et écorce [1,022]), le bouleau (1,179), le giroflier (feuille et bouton floral), le sassafras, les gaulthéries (couchée et odorante [1,19]). (JOUAULT, 2012).

Déterminer par le rapport de la masse (g) d'un certain volume d'HE ($m_2 - m_0$) à la masse d'un volume égal d'eau distillée ($m_1 - m_0$). Pour mesurer la densité relative de l'HE, nous avons utilisé un pycnomètre de 1,5 ml. La procédure consiste à peser le pycnomètre vide, rempli d'eau distillée et rempli d'HE (ARAB *et al*, 2014).

6-1-3-Pouvoir rotatoire :

Le pouvoir rotatoire est la capacité de certaines molécules de provoquer une rotation du plan de polarisation lorsqu'elles sont traversées par un faisceau de lumière polarisée plan. Cette rotation peut être orientée vers la droite (dextrogyre (+)) ou vers la gauche (lévogyre (-)). Cette activité optique est quantifiée à l'aide d'un polarimètre et sa mesure est exprimée en degrés (°) (KALOUSTIAN et HADJI-MINAGLOU, 2013).

6-1-4-Solubilité :

Les huiles essentielles sont solubles dans l'alcool, l'éther, et les huiles à des degrés différents. Elles sont insolubles dans l'eau. Cependant les huiles essentielles communiquent leur odeur à l'eau (MANSARD, 2016).

6-2-Caractères chimiques :

6-2-1-Indice d'acide (ISO 1242 :1999) :

L'indice d'acide IA est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle.

$$I_A = V \cdot C \frac{56,11}{m}$$

Où : V est le volume, en millilitres, de solution d'hydroxyde de potassium utilisée pour le titrage.

C : c 'est la concentration exacte, en mole par litre, de la solution d'hydroxyde de potassium.

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

Cependant, cette mesure n'est pas applicable pour les huiles essentielles présentant des concentrations importantes en lactones.

6-2-2-Indice de peroxyde :

L'indice de peroxyde IP exprime, en milliéquivalents d'oxygène actif, la quantité de peroxyde contenue dans 1 000 g de substance. Cet indice reflète le degré d'oxydation d'une huile essentielle. Plus celui-ci est élevé, plus l'oxydation est importante.

6-2-3-Teneur en eau (ISO 11021 :1999) :

La teneur en eau détermine la quantité d'eau présente dans une huile essentielle considérée. Elle est exprimée comme la fraction massique W_w , représentant le rapport de la masse d'eau m_e à la masse totale de l'échantillon d'huile essentielle m_{HE} .

$$W_w = \frac{m_e}{m_{HE}}$$

La teneur en eau est déterminée peut être déterminé selon la méthode de Karl Fischer.

7-Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Les gouttelettes d'huile stockées dans les glandes ou les sacs d'huile peuvent être extraites soit par accélération de la diffusion à travers la paroi de la cellule, soit par écrasement de la paroi cellulaire. Les techniques adoptées dépendent de la partie des plantes où l'huile doit être extraite, de la stabilité de l'huile à la chaleur et de la sensibilité des constituants de l'huile aux réactions chimiques (HAMID et *al*, 2011).

7-1-Distillation par entrainement à la vapeur d'eau :

C'est la méthode la plus commune d'extraction des huiles et constitue la plus ancienne forme d'extraction des huiles essentielles. Dans cette technique, la plante souhaitée (fraîche ou séchée) est d'abord placée dans un récipient (Figure 5). La vapeur est ajoutée et passée à travers la plante qui contient les molécules aromatiques. Une fois la plante libère ces molécules aromatiques et dans l'état, les molécules aromatiques sont entraînées dans un système fermé vers le dispositif de refroidissement. L'eau froide est utilisée pour refroidir les vapeurs. Comme ils refroidissent, ils se condensent et se transforment en un état liquide (HAMID et *al*, 2011).

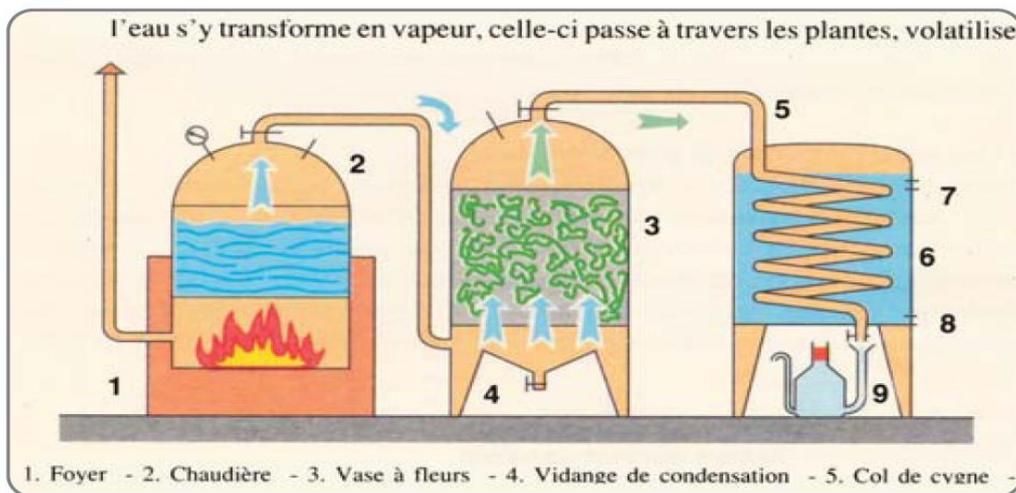


Figure 5 : Schéma du processus de la distillation par entrainement à la vapeur d'eau, (LARDY, 2007)

7-2-Distillation à l'eau :

Le principe de la distillation à l'eau (Figure 6) est de faire bouillir une suspension de plante aromatiques et de l'eau au point que sa vapeur puisse se condenser, l'huile qui est immiscible avec l'eau, est ensuite séparée. Le facteur le plus important est que dans le distillateur où l'eau est bouilli par contact direct avec le feu, l'eau présente dans le distillateur doit toujours être

plus que suffisante pour persister au long de la distillation, autrement, le matériel végétal peut être surchauffé et carbonisé, quand ça arrive, des off-notes sont formé de réactions de Maillard (TULEY DESILVA, 1995).

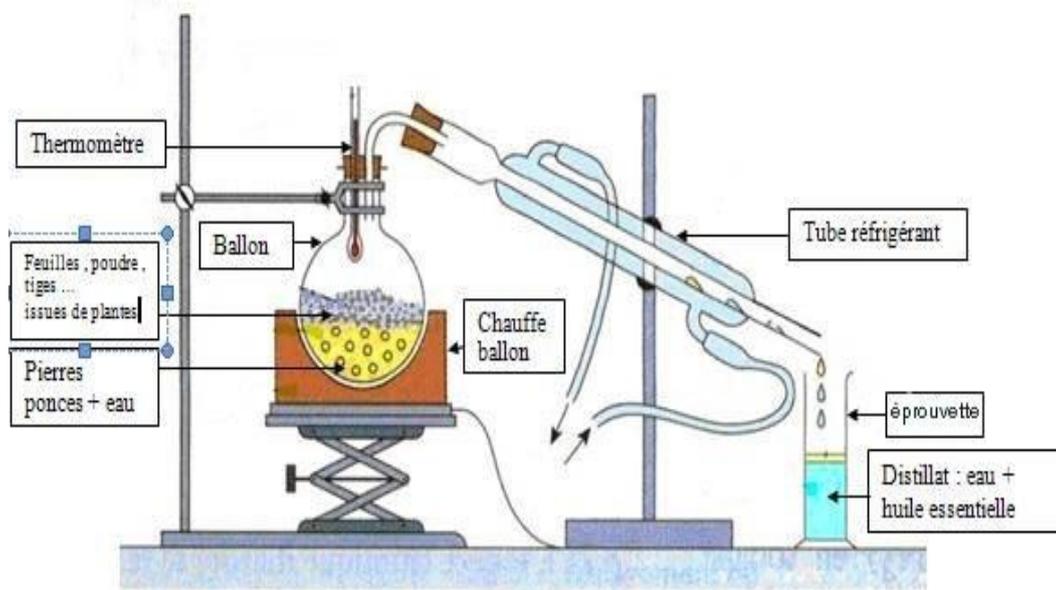


Figure 6 : Schéma de l'appareillage d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.

7-3-Expression des épicarpes :

Le principe de la méthode est très simple : les zestes sont lacérés et le contenu des poches sécrétrices, qui ont été rompues, est récupéré par un procédé physique. Le procédé classique consiste à exercer, sous un courant d'eau, une action abrasive sur la surface du fruit. Après élimination des déchets solides, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par centrifugation. (FIGUEREDO, 2012).

7-4-Distillation sèche :

Contrairement à l'entraînement à la vapeur d'eau, cette technique est utilisée pour l'extraction des huiles essentielles à partir d'écorce ou de bois, la distillation est obtenue par leurs chauffages à température élevée. Elle n'utilise pas d'eau liquide ou sous forme vapeur, le bois est placé dans une cuve de distillation ou le four est situé autour de la cuve. La chaleur produite par le four dans le couloir de chauffage permet la combustion du bois. Le distillat est

récupéré dans une cuve de condensation. Le liquide condensé passe ensuite dans une cuve de décantation afin de séparer l'eau et l'huile essentielle (MANSARD, 2016).

7-5- Extraction par solvants volatils :

L'extraction par solvant consiste à dissoudre les composés d'huiles essentielles dans un solvant non miscible avec l'eau et à séparer la phase organique contenant les composés à extraire de la phase aqueuse. Le solvant utilisé dépend de la partie de la plante à utiliser pour l'extraction. Par exemple, les feuilles, les racines, les fruits sont extraits avec du benzène avec ou sans mélange d'acétone ou d'éther de pétrole, à froid ou à point d'ébullition, tandis que les fleurs sont extraites avec des éthers. Le solvant pénètre dans la plante pour dissoudre les cires et la couleur de l'huile (HAMID *et al*, 2011)

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone (KIM et LEE, 2002).

Après l'extraction, le solvant est éliminé par distillation sous pression réduite en laissant derrière le concentré semi-solide, ce concentré est extrait avec de l'éthanol absolu. Le second extrait est refroidi pour précipiter les cires puis filtré. Cette solution alcoolique sans cire est distillée sous pression réduite pour éliminer l'alcool de l'huile essentielle (HAMID *et al*, 2011)

7-6-Autres procédés :

Depuis quelques années on assiste au développement de nouvelles technologies. C'est en particulier le cas de l'hydrodistillation par micro-ondes sous vide. Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : l'huile est entraîné dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée (sans ajout d'eau pour les produits traités en frais). Très rapide et peu consommateur d'énergie, le procédé livre un produit qui, le plus souvent, est de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (temps de travail divisé par 5 à 10 et température plus basse) (BRUNETON, 1999).

8-Conservation des huiles essentielles :

Il va de soi que la relative instabilité des molécules constituant les huiles essentielles rend leur conservation difficile. Les possibilités de dégradation sont nombreuses, facilement objectivées par les indices (peroxydes, réfraction), par la détermination des caractères physiques

(viscosité, miscibilité à l'alcool, pouvoir rotatoire) et/ou par l'analyse en CPG. (BRUNETON, 1999).

Les différents types de dégradation sont multiples comme par exemple photo-isomérisation, photocyclisation, coupure oxydative, peroxydation et décomposition en cétones et alcools, thermo-isomérisation, hydrolyse et transestérification. Ces dégradations peuvent modifier les propriétés et/ou mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle (MANSARD, 2016).

Les huiles essentielles ne devraient pas être conditionnées dans des flacons transparents. Elles sont en effet sensibles à la lumière, à l'air et à la température et doivent par conséquent être conservées dans des récipients protecteurs, comme des flacons de verre brun, bleu ou laiteux par exemple (TEUSCHER, 2005).

9-Toxicité des huiles essentielles

Les HE sont des molécules actives. Elles peuvent avoir de graves effets secondaires. Il est important de respecter la posologie et la durée de la prise. Parmi ces effets, citons : des allergisants ou hypersensibilisants, photosensibilisants due aux furocoumarines, neurotoxiques dus aux cétones, néphrotoxiques dus aux terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de Térébenthine et des rameaux de Genévrier, hépatotoxiques dus aux phénols pris pendant des laps de temps trop importants ou à doses massives L'eugénol, qui est l'un des constituants du Thym, est hépatotoxique (LAMAMRA, 2007).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aigüe par voie orale faible ou très faible : la majorité des huiles qui sont couramment utilisées ont une dose létale (DL50) comprise entre 2 et 5 g/kg (Anis, Eucalyptus, Girofle...etc.) ou, ce qui est le plus fréquent, supérieure à 5 g/kg (Camomille, Lavande...etc.). D'autres, une quinzaine, ont une DL50 comprise entre 1 et 2 g/kg : Basilic, Estragon, Hysope (1,5ml/kg). Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo (0,13 g/kg ; convulsions apparaissant dès 0,07 g/kg), de Chénopode (0,25 g/kg), de Thuya (0,83 g/kg), ainsi que l'essence de moutarde (0,34 g/kg) (BRUNETON, 1999).

Chapitre II Activité antimicrobienne des huiles essentielles

1-Activité antimicrobienne

1-1-Activité antibactérienne

Le spectre d'action des huiles essentielles est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (KALEMBA et KUNICKA, 2003)

DEANS et RITCHIE (1987) ont étudié l'activité antibactérienne de 50 huiles essentielles sur 25 genres de bactéries en utilisant la technique de contact direct en milieu solide avec 4 concentrations différentes en huiles, sous leur forme non diluée, ils ont conclu que toutes les huiles essentielles inhibent au moins un genre bactérien. Il en a ressorti les 10 huiles essentielles qui présentent la plus grande efficacité : le thym, la cannelle, la baie, le girofle, l'amande (amère), Livèche, le piment, Marjolaine, angélique et noix de muscade.

Ces huiles contenant principalement des aldéhydes ou des phénols tels que le cinnamaldéhyde, le citral, Le carvacrol, l'eugénol ou le thymol en tant que composantes principales ont montré l'activité antibactérienne la plus élevée, suivie Par des EO contenant des alcools terpéniques. D'autres EO, contenant des cétones ou des esters, tels que le β -myrcène, L' α -thujone ou l'acetate de geranyle a eu une activité beaucoup plus faible, alors que les huiles volatiles contenant du terpène Les hydrocarbures étaient habituellement inactifs (BASSOLE et JULLIANI, 2012)

Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, c'est le cas des staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) (MAY *et al.*, 2000), et des entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (FISHER et PHILLIPS, 2009).

SHIN et KIM (2005) ont aussi démontré la capacité d'inhibition de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Samonella typhimurium*, *Salmonella entereditis* et *S. aureus* par l'huile de thym de deux espèces de la Corée : *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*. Il est a noté que la bactérie reconnue comme la moins sensible à l'effet des

huiles essentielle reste néanmoins la bactérie Gram négative *P. aeruginosa* (DORMAN et DEANS, 2000).

1-2-L'activité antifongique :

L'activité antifongique dépend strictement de la composition et des proportions des composés chimiques, KURITA et al (1981) ont classé ces composés purs selon leurs activités antifongiques vis-à-vis de sept champignons. Cette activité a été estimée selon la durée d'inhibition de la croissance observée sous microscope, ainsi ils ont déterminé l'échelle suivante :

(+) Phénols >Alcools>Aldéhyde>Cétone>Ether>Hydrocarbures (-)

Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol > thymol > isoeugénol > eugénol) (ULTREE et al, 2002).

Pour étudier leurs activités, JANSSEN et al (1988) ont testé le pouvoir inhibiteur de 53 huiles essentielles vis-à-vis de trois champignons dermatophytes : *Epidermaphyton floccosum*, *Trichophyton metagrophytus* et *T. rubrum*. Les résultats montrent que toutes les huiles essentielles riches en thymol, carvacrol, eugénol et cinnamaldehyde sont très actives sur les 3 microorganismes testés. L'action antifongique principale semble être exercée sur la membrane cellulaire (COX et al, 2001).

L'activité fongicide de l'huile essentielle d'*E.caryophyllata* a également été reportée sur plusieurs espèces de champignons alimentaires (VELLUTI et al, 2004) Et il a été observé dans une étude récente que l'huile essentielle de clous de girofle a même inhibée la croissance D'*Aspergillus niger* (PAWAR et THAKER, 2006).

1-3-Activité antivirale :

Les virus sont des particules submicroscopiques (allant de 20 à 300 nm) qui peuvent infecter les cellules d'un organisme biologique. Ils se reproduisent uniquement en infectant une cellule hôte et ne peuvent se reproduire eux-mêmes. Contrairement aux organismes vivants, les virus ne répondent pas aux changements dans leur environnement (BUCHBAUER, 2010).

D'une manière générale, les virus sont très sensibles à la Composants d'huiles essentielles et de phénylpropanoïdes, Les monoterpènes et les monotèrenals ont montré in vitro un forte Activité antivirale. Les huiles essentielles sont capables de supprimer les virus de différentes façons. Ils peuvent inhiber leur réplication ou ils peuvent empêcher leur propagation d'une cellule à l'autre. HUSSEIN et al (2000) a trouvé que l'extrait de *Syzygium aromaticum* était très actif pour l'inhibition de la réplication du virus de l'hépatite C. KUROKAWA et al (1998) a isolé et identifié un composé anti-HSV, eugeniin, à partir des extraits de de la même plante, qui A montré une spécificité dans l'inhibition de l'activité d'ADN polymérase de l'HSV-1.

1-4-Activité antiparasitaire :

Les huiles essentielles ou les plantes dont elles sont obtenues ont été utilisées depuis des siècles pour protéger les produits stockés ou pour repousser les parasites des habitations humaines. (ISMAN et MACHIAL, 2006).

Certains auteurs ont étudié les effets antiparasitaires potentiels d'huiles essentielles contre divers types de parasites tels que les protozoaires, les helminthes et les arthropodes ; Cependant, les mécanismes moléculaires d'action sont peu étudiés.

L'activité antiparasitaire de deux huiles essentielles de lavande ont été testées contre les agents pathogènes protozoaires humains *Giardia duodenalis* et *Trichomonas vaginalis* et aussi contre le pathogène du poisson *Hexamita inflata* . Les deux huiles essentielles éliminent complètement les trois protozoaires dans les tests in vitro (SHARIFI-RAD et al, 2017)

L'huile riche en carvacrol (64%) d'*Origanum onites* et de Carvacrol a été jugée efficace contre la tique *Rhipicephalus turanicus*. Le carvacrol pur a tué toutes les tiques après 6 h d'exposition, tandis que 25% et des concentrations plus élevées de l'huile ont été efficaces pour tuer les tiques par le post-traitement de 24 heures (COSKUN et al, 2008).

Cent cinquante huiles essentielles ont été testées pour connaître leurs effets acaricides sur *Varroa*. Parmi les composés testés, seul le thymol s'est imposé pour la lutte biologique contre cet acarien (IMDORF et al, 2006).

2-Autres activités des huiles essentielles :

2-1-Activité antioxydante :

Plusieurs études ont démontré les propriétés antioxydantes des huiles essentielles, ou le potentiel antioxydant dépend de sa composition. Il est bien démontré que les composés phénoliques et les métabolites secondaires avec des conjugaisons de doubles liaisons montrent usuellement des propriétés antioxydantes substantielles (KOH *et al*, 2002)

Les huiles essentielles de Cannelle, noix de muscade, girofle, basilic, persil, origan et thym sont caractérisés par les propriétés antioxydantes les plus importantes, le thymol et le carvacrol sont les composants les plus actifs. Leur activité est reliée à leur structure phénolique qui leur confère des propriétés redox, et donc joue un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres et aussi sur la décomposition des peroxydes (DHIFI *et al*, 2016)

L'activité antioxydante des huiles essentielles est aussi due à certains alcools, éthers, cétone, aldéhyde, et des monoterpènes : linalol, 1,8-Cineol, citral ... (ARUOMA, 1998)

2-2Activité anti-inflammatoire :

En plus de la capacité de certaines huiles essentielles à éliminer les radicaux libres, il existe également des preuves que certaines huiles essentielles possèdent une activité anti-inflammatoire (MIGUEL 2010). Les composés actifs agissent en inhibant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs d'inflammation. (DHIFI *et al*, 2016)

L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles peut être attribuée non seulement à leurs activités antioxydantes, mais aussi à leurs interactions avec des cascades de signalisation impliquant des cytokines et des facteurs de transcription régulateurs et à l'expression de gènes pro-inflammatoires. Les huiles essentielles, par conséquent, Représentent une nouvelle option dans le traitement des maladies inflammatoires (DHIFI *et al* 2016)

Les huiles essentielles (eucalyptus, romarin, lavande, millefolia) ainsi que d'autres plantes (pin, cloué et myrrhe) qui ont été utilisées comme formulations mixtes comme anti-inflammatoires dans l'aromathérapie traditionnelle (SANTOS *et al*, 2000).

2-3- Activité anticancéreuse :

Les huiles essentielles pourraient également exercer des effets anticancéreux parce qu'il existe une relation directe entre la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et les états oxydatifs et inflammatoires qui peuvent conduire au cancer (SHARIFI-RAD, 2017). Il existe plus de cinq cents articles publiés portant sur l'activité anticancéreuse des huiles essentielles, et Plus d'une centaine appartenant à plus de vingt familles végétales ont été testées plus que Vingt types de cancers (BAYALA et *al*, 2014).

2-4-Activité insecticide et répulsive :

Dans notre société actuelle, il y'a un intérêt croissant pour l'utilisation probable des extraits de plantes comme alternative aux insecticides synthétiques à cause des nombreux inconvénients qu'ils présentent.

L'intérêt pour ces produits a été considérable, en particulier pour le contrôle des parasites et des maladies de la serre et pour le contrôle des ravageurs domestiques et vétérinaires. Elles peuvent aussi être utilisé comme répulsif contre les moustiques et les cafards Et la prévention des nouvelles infestation dans les habitats humains (ISMAN et MACHIAL 2006).

Les composés d'huiles essentielles et leurs dérivés sont considérés comme un moyen alternatif de contrôler de nombreux insectes nocifs (THRIPATHI et *al*, 2009). Parmi les huiles essentielles plus actives, on trouve celles du thym, de l'origan, du basilic, du romarin et de la menthe, mais beaucoup plus d'essais empiriques utilisant des espèces de plantes moins communes et un éventail plus large d'espèces de ravageurs révéleront sans aucun doute des activités biologiques particulièrement valorisable.

PAPACHRISTOS et STAMOPOULOS, 2002 ont testé Treize huiles essentielles dont ceux de *Laurus nobilis* qui ont été utilisées sous formes de vapeur contre une espèce d'insectes attaquant les produits alimentaires stockés, le cas *Acanthoscelides obtectus* (bruche du haricot). Les résultats ont indiqués que l'huile essentielle du *Laurus nobilis* a une action répulsive, réduit la fécondité, diminue la couvaison d'oeufs, et augmente la mortalité larvaire de nouveau-né.). Une étude similaire sur l'huile essentielle *Laurus nobilis* a été réalisée par ERLER et ses collaborateurs, 2006, contre les femelles adultes d'une espèce de moustique (*Culex pipiens*), cette huile a montré un degré de répulsion intéressant contre ces parasites vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria, fièvre jaune, dengue, encéphalite,etc.

L'activité insecticide change avec l'espèce d'insecte, le composé et le temps d'exposition. Les résultats ont prouvé que ces composés peuvent convenir comme fumigène en raison de leur volatilité élevée, efficacité et leur sûreté (non toxique aux humains) (ROZMAN *et al.*, 2007).

2-Mécanisme d'action des huiles essentielles sur les bactéries :

L'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (KALEMBA ET KUNICKA, 2003 ; BURT, 2004). Compte tenu du grand Nombre de groupes différents de composés chimiques présent dans les huiles essentielles, il est très probable que leurs activité antibactérienne n'est pas attribuable à un mécanisme spécifique mais qu'il existe plusieurs cibles dans la cellule (CARSON *et al.*, 2002).

Les huiles essentielles semblent posséder plusieurs modes d'action sur les différents microorganismes, car ils perturbent en grande partie les membranes cellulaires conduisant à la nécrose des microbes procaryotes et eucaryotes. La paroi cellulaire bactérienne et la membrane cellulaire sont des barrières importantes qui régulent le mouvement des substances entre la cellule et son environnement. Les fragments lipophiles présents dans la plupart des huiles essentielles traversent librement la paroi cellulaire et s'accumulent dans la membrane cytoplasmique conduisant à des changements marqués de la membrane : Stabilité, hydrophobicité, fluidité et composition d'acide gras (PREEDY, 2016), et par la suite, la perte des électrolytes et la réduction du niveau des sucres et des acides aminée (Figure 7), (INOUYE *et al.* 1998). En fonction de l'importance de la perte de matériel et l'indispensabilité des éléments cytoplasmiques relégués que s'opère la mort cellulaire.

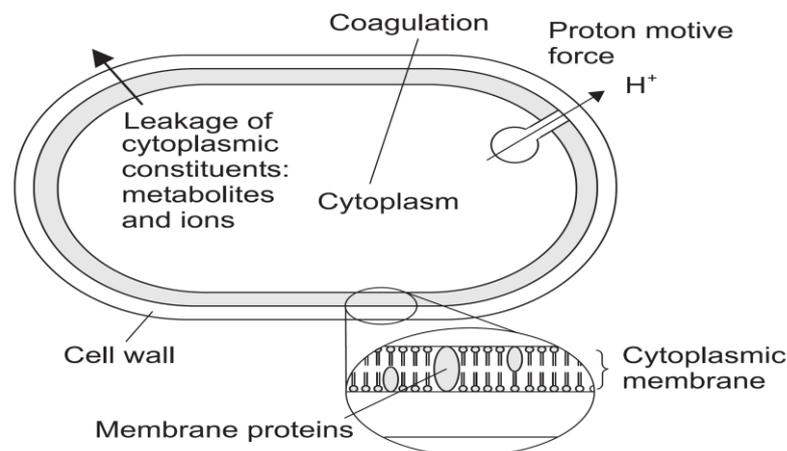


Figure 7 : Localisation et mécanisme d'action des composants d'huiles essentielles sur les bactéries (BURT, 2004)

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (BURT, 2004).

3-Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles :

L'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est étroitement liée à sa composition chimique. Et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (LAHLOU, 2004) Les changements dans la composition d'une huile essentielle est dépendante des facteurs suivants :

- La source botanique (certaines huiles commerciales dérivent de différentes espèces).
- La provenance du matériel végétal.
- Le temps de récolte (heure du jour, stade de développement).
- Le matériel végétal étant frais ou séché.
- La technique d'isolation (distillation à la vapeur, hydrodistillation, extraction par solvants). (JANSSEN et *al* 1987).

Divers autres facteurs apparaissent dans leurs applications sur des matrices alimentaires. Il s'agit notamment de l'apparition de bactéries résistantes, des conditions qui déstabilisent l'activité biologique des agents antimicrobiens à savoir : la température, les conditions de stockage, le pH ou la composition de l'aliment, inactivation par d'autres additifs, faible solubilité et la répartition de la matrice alimentaire, ou encore de la quantité d'oxygène dans l'emballage (CAILLET et LACROIX, 2007. TIWARI et *al*, 2009).

4-Effet de combinaison des huiles essentielles :

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est conditionnée par l'activité de leurs composants. L'effet synergique avantageux des constituants de l'huile essentielle a souvent été observé (KALEMBA et KUNICKA, 2003).

Certaines études on conclue que l'ensemble de l'huile essentielle a une activité antibactérienne plus importante que celle des composants majoritaire seuls mélanger (MOUREY et CANILLAC, 2002), ce qui suggère que les composants mineurs sont critiques pour l'activité et peuvent avoir un effet synergique ou une influence potentielle (BURT, 2004).

En contrepartie, les composants de traces peuvent Provoquent également des interactions antagonistes, qui ont été observées en comparant l'effet antimicrobien du carvacrol pur dans l'huile d'origan ou le carvacrol est un constituant majeur, étant donné que le carvacrol pur était 1500 Fois plus efficace que l'huile essentielle brute (RAO et *al*, 2010).

Les huiles essentielles individuelles peuvent contenir des mélanges complexes. Les interactions entre les composés antimicrobiens peuvent entraîner des effets additifs, synergiques ou antagonistes (DELAQUIS et *al*. 2002). Ainsi, La synergie survient lorsque le mélange de deux composés antimicrobiens a une activité antimicrobienne supérieure à la somme des composants individuels. Un effet additif est obtenu lorsque la combinaison d'antimicrobiens a un effet combiné égal à somme des composés individuels. L'antagonisme survient lorsqu'un Mélange de composés antimicrobiens a un effet combiné inférieur à lorsqu'il est appliqué séparément (HYLDGAARD et *al*, 2012). Cependant, l'absence d'interaction est définie comme étant une indifférence.

BASSOLE et JULIANI (2012) ont revu certaines propriétés antimicrobiennes de combinaisons d'huile essentielle. Dans leur revue, ils présentent le type d'interaction antimicrobienne d'une liste de combinaisons d'huiles essentielles et de combinaisons de quelques molécules aromatiques. Ils ont testé l'huile essentielle d'origan (*Origanum vulgare*) riche en thymol et en carvacrol en combinaison avec les huiles du romarin (*Rosmarinus officinalis*), du thym (*Thymus vulgaris*), du basilic (*Ocimum basilicum*), et à la marjolaine (*O. majorana*), ainsi qu'au citron baume (*Melissa officinalis*). Dans la plupart des cas, seuls des effets additifs ont été observés, seule la combinaison avec de l'huile de romarin a donné des effets synergiques.

Afin d'abaisser la concentration d'huiles essentielles sans compromettre leur activité antimicrobienne on peut appliquer des combinaisons minime avec d'autres composés antimicrobiens qui fournissent un effet synergique, notamment les acides organiques (NGUEFACK et *al* (2012). Comme dans le cas des études de combinaison effectuer par ZHOU et *al* (2007), qui ont étudié la combinaison du thymol et du carvacrol avec EDTA, acide acétique, acide citrique, dont il résulte la réduction significative de population de *S. typhimurium*.

5-Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne

5-1-L'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné d'huile essentielle (figure 8), (BILLERBECK, 2007). Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des substances à tester, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes (PIBIRI, 2006).

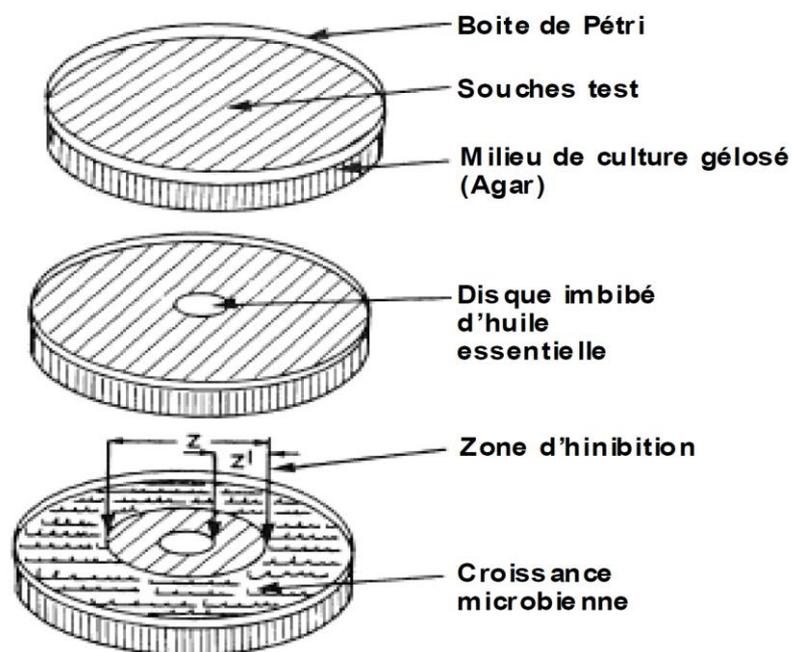


Figure 8 : Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri (ZAIKA, 1987)

5-2-Microatmosphères

Le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celle des aromatoigrammes. Elle consiste à placer l'huile essentielle, qui se trouve dans une petite tasse ou sur un disque de papier filtre, à l'intérieur d'un couvercle de pétri Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé (figure 9). On mesure la «zone d'inhibition» après une incubation appropriée du milieu de croissance inoculé avec le microorganisme d'essai (ZAIKA, 1987)

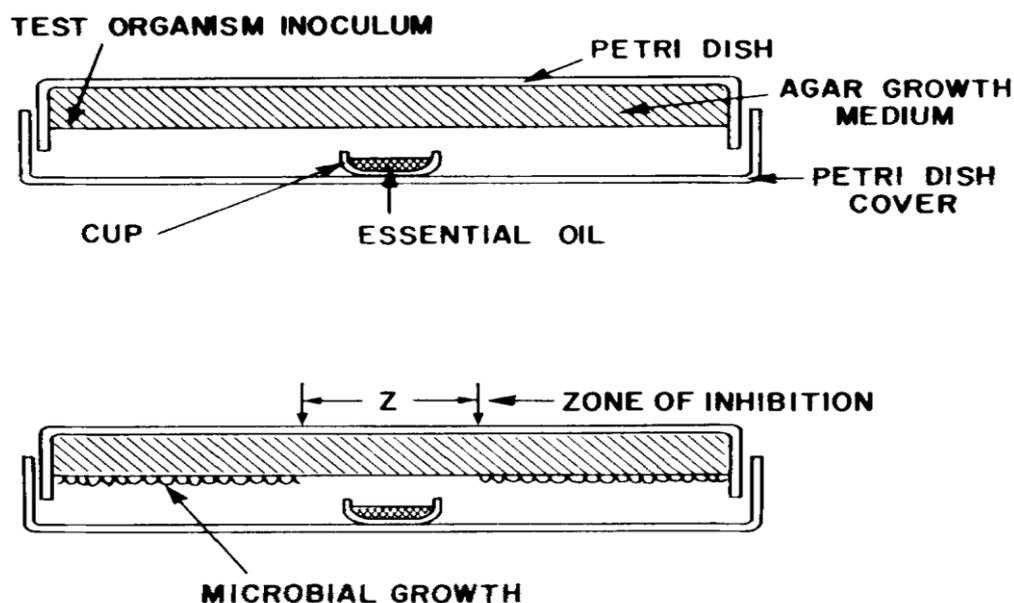


Figure 9 : Illustration de la méthode des microatmosphères (ZAIKA, 1988)

5-3-Méthode de microdilution

Elle est effectuée en milieu liquide ou en milieu solide. En milieu liquide, l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes ou en microplaques contenant l'agent antimicrobien. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube dont on n'observe aucune croissance visible et qui contient la plus faible concentration du produit (RIOS, 1988).

En milieu solide, l'huile essentielle ou l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface estensemencée avec un inoculum des souches à étudier. Après incubation, la CMI correspond au milieu contenant la plus faible concentration d'huile essentielle. (PIBIRI, 2006).

5-4-La méthode de diffusion en puits ou en cylindre :

Le principe de cette technique est semblable à la méthode de disque, ou les disques sont remplacés par un puits creusé stérilement sur la géloseensemencée. Cette méthode assure une diffusion radiale de l'H.E. à partir du puits, L'incubation des boîtes de Pétri ce fait à la température optimale de croissance du micro-organisme permet le développement des colonies. La formation d'un halo clair autour du puits indique l'absence de la croissance microbienne dont le diamètre dépend de la sensibilité à l'huile essentielle (WAN, WILCOCK, & COVENTRY, 1998).

Chapitre III : Domaines d'application des huiles essentielles

1-Agroalimentaire

Les huiles essentielles sont utilisées dans les domaines nutritionnels et agricoles pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, antiviraux, nématocides, insecticides et antioxydants rapportés (TUREK et STINTZING, 2013). On les retrouve dans une grande variété de biens de consommation tels que les produits alimentaires de confiserie, les boissons gazeuses et les distillés boissons alcoolisées. En plus de leur utilisation répandue comme matière aromatisante (KETTENRING et GEEGANAGE, 2010),

Les huiles essentielles sont généralement sûres avec un minimum d'effets secondaires. Plusieurs d'entre eux ont été approuvés comme additifs alimentaires et Tomber dans la catégorie de généralement reconnue comme sûre par les États-Unis Food and Drug Administration (ALI et al, 2015). Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments, mais l'évaluation de leurs propriétés antimicrobiennes demeure très importante pour les exploiter dans l'industrie comme étant des conservateurs naturels (GUESMI et BOUDABOUS, 2006).

Le contrôle de la détérioration des aliments et des bactéries pathogènes est principalement réalisé par un contrôle chimique, mais l'utilisation de ces produits de synthèse est limitée en raison d'aspects indésirables, y compris la cancérogénicité, la toxicité aiguë, la tératogénicité et les périodes de dégradation lente, ce qui pourrait entraîner des problèmes environnementaux tels que la pollution.

Compte tenu des données publiées sur l'application des huiles essentielles dans les aliments, on peut établir le classement général approximatif suivant (dans un ordre de la diminution de l'activité antibactérienne) : origan / clou de girofle / coriandre / cannelle> thym> menthe> romarin>Moutarde> coriandre / sauge. Un classement général approximatif des composants des huiles essentielles est le suivant (dans l'ordre de l'activité antibactérienne décroissante): eugénol> carvacrol / acide cinnamique> basilic méthyl chavicol> cinnamaldéhyde> citral / geraniol. (BURT, 2004).

2-Cosmétique :

L'utilisation d'huiles essentielles dans l'industrie des cosmétiques, du savon, des détergents et des parfums est d'un grand intérêt du point de vue économique. La production mondiale d'huiles essentielles pour la préparation des parfums a nettement augmenté, avec des groupes

spécifiques de plantes aromatiques très recherchés sur le marché. Les chimiotypes concrets de salvia, de lavande et de thym sont particulièrement appréciés pour l'obtention de parfums fins et nouveaux. À cette fin, la technologie de production et une sélection adéquate de la matière première brute sont des éléments essentiels pour améliorer la qualité du produit final (COOK T et LANARAS 2016).

Des exemples de ces thérapeutiques orientés vers la beauté sont les régénérateurs de tissus cutanés, Agents anti-rides et anti-âge crèmes. Produits de soins de la peau tels que des crèmes pour la peau, Les toniques de la peau, etc. dérivés des plantes médicinales sont regroupés comme Dermaceuticals (HOAREAU et DASILVA 1999)

Les huiles essentielles, a l'état dilue, sont utilisées dans les parfums et les eaux de toilettes. Actuellement, ce sont davantage les molécules de synthèse qui entrent dans la composition très complexe et confidentielle mise au point par les grands parfumeurs. Ainsi certains composés on leurs caractéristiques spécifiques comme : aldéhyde cinnamique (odeur caractéristique de la cannelle), benzaldehyde (imite l'odeur de l'amande amere), vanilline (pour les parfums chauds, doux et ambres) dihydrojasmonate de méthyle (odeur caractéristique du jasmin) (KALOUSTIAN et HADJI- MINAGLOU, 2013).

3-Pharmaceutique :

Les huiles essentielles sont utilisées en produits pharmaceutiques pour leur potentiel en tant qu'agents médicinaux (HARRIS, 2010), les huiles essentielles ne sont généralement pas recommandées pour un usage interne non dilué en raison de leur toxicité, ni pour une application directe sur la peau, avec le risque de dermatite, de réaction allergique ou de photosensibilisation cutanée. Cependant, l'application topique de certaines huiles essentielles telles que la lavande et l'origan lorsqu'il est dilué dans les huiles végétales aide La guérison des plaies et des brûlures. Les huiles essentielles sont utilisées comme analgésiques, Les expectorants, les décongestionnants (menthol et les eucalyptus), les antiseptiques, les arômes pour neutraliser les goûts désagréables et autres. (COOK et LANARAS, 2016).

La listerine qui est une solution constituée de composée issue d'huile essentielle : le thymol et l'eucalyptol qui possède une grande activité bactéricide en synergie sur les microorganismes de la gencive et des plaques dentaires (KATO et *al*, 1990).

Il faut noter la différence entre l'activité d'une huile essentielles et celle de la plante dont elle est issue. Il faut savoir qu'une telle superposition n'est que rarement possible : ainsi, l'huile essentielles de romarin est antibactérienne alors que l'infusé de la même espèce est traditionnellement utilisé pour le traitement symptomatique de trouble digestifs divers sur la base des propriétés antispasmodique et cholérétiques peut être liées à la présence de composés phénoliques (BRUNETON, 1999).

4-Aromathérapie :

Les huiles essentielles ont trouvé leur importance comme parfum avec un potentiel curatif sur le corps, l'esprit et l'esprit. Ces molécules d'arôme sont des produits chimiques végétaux organiques très puissants qui rendent l'environnement exempt de maladies, de bactéries, de virus et de champignons (BARATA et *al* 1993, BARATA et *al*, 2011). Leur caractère polyvalent de nature antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire ainsi que le corps immunitaire avec effet hormonal, glandulaire, émotionnel, circulatoire, apaisant, mémoire et amplificateur de vigilance, est bien documenté par de nombreux scientifiques (ALI et *al*, 2015)

L'aromathérapie peut être la principale application d'huiles essentielles comme agents médicaux. L'administration d'huiles essentielles obtenues à partir de différentes sources s'effectue par une variété de méthodes d'application. (RIOS, 2016)

L'huile essentielle d'eucalyptus dont le constituant majoritaire, est l'eucalyptol (1,8-cinéole), est souverain dans les affections des voies respiratoires car Elle renferme aussi des composés phénoliques et sesquiterpéniques. Aux propriétés balsamiques, mucolytiques, antitussives et expectorantes, s'ajoute une action fébrifuge. C'est le remède éprouvé des bronchites, des toux persistantes. (HAMMICHE, 2014) l'huile essentielle de Citrus (mélange entre bergamote, citron et oranger) améliorerait la balance homéostatique des patients déprimés. L'amélioration du stress mental renforçait la défense immunologique de la peau (INOUYE, 2007).

La tendance actuelle serait l'utilisation bénéfique de cette activité antiseptique, notamment, pour purifier l'air atmosphérique dans les centres de soins (hôpitaux, clinique) et aussi dans les maisons individuelles par diffusion d'huiles essentielles dans l'air (KALOUSTIAN et HADJIMINAGLOU, 2012).

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, pendant une durée de trois mois

Il visait à :

- Evaluer le pouvoir inhibiteur de la croissance bactérienne de l'huile essentielle de thym à linalol, de laurier noble, et de l'acide citrique.
- Déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), ainsi que les concentrations minimales bactéricides (CMB) des substances actives.
- Etudier l'effet combiné exercé par les différents agents antimicrobiens utilisés par association deux à deux.

I. Protocole expérimental

Notre travail expérimental est fondé sur cinq expériences, la première expérience a été consacrée à l'étude de l'effet antibactérien et antifongique de l'huile essentielle du thym neuf concentrations différentes : 100%, 75%, 50 %, 25%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1% (v/v), puis quatre concentrations de l'huile essentielle de laurier : 100%, 75%, 50%, 25%, et enfin six concentrations d'acide citrique : 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%.

Après détermination des CMI pour chaque agent antimicrobien, des combinaisons deux à deux entre ces agents ont été effectuées à des différentes concentrations afin de mettre en évidence leur effet combiné sur les souches étudiées.

II. Les agents antimicrobiens testés

II.1. L'huile essentielle de thym

L'huile essentielle de Thym (commerciale) testée durant notre étude est obtenue par extraction à la vapeur d'eau des parties aériennes (rameaux fleuris) de la plante venant d'Espagne *Thymus vulgaris linaloliferum*, il s'agit du thym à linalol. Elle est à 100% pure, naturelle et chémotypée, issue de l'agriculture biologique et certifiée par FR-BIO-01Agriculture UE/non UE, ainsi par Ecocert SAS F32600 (ISO), achetée en France par le Laboratoire d'aromathérapie cosbionat, elle a été conservée à l'obscurité et au frais.

II.2. L'huile essentielle de laurier

L'huile essentielle de laurier (commerciale) est une huile à 100% pure, naturelle et chémotypée, obtenue à partir des feuilles de laurier noble, produit issu de l'agriculture biologique et certifiée par FR-BIO-01 Agriculture UE/non UE, ainsi par Ecocert SAS F32600 (ISO). Elle est achetée en France par le Laboratoire AeL Création, elle a été conservée à l'obscurité et au frais.

III. Matériel biologique

Le choix des souches bactériennes testées dans cette étude a été basé sur l'implication dans la pathologie humaine, l'altération des aliments ainsi que leurs résistances aux antibiotiques. Pour cela nous avons sélectionné : deux bactéries à Gram+, trois bactéries à Gram-, et une levure, qui sont représentées dans le Tableau I

Tableau IV : Descriptions des différents microorganismes utilisés dans cette étude.

Souches bactériennes	Morphologie et type de Gram	Habitat et origine	Pouvoir pathogène
Escherichia coli	Coccobacilles a Gram négatif	Commensale du tube digestif de l'homme et des animaux	Diarrhées, gastro-entérites, infections urinaires
Pseudomonas aeruginosa	Bacilles à Gram négatif	Germe ubiquitaire, vivant en milieu humide et fréquent en milieu hospitalier	Infections pulmonaires, infections urinaires, méningites, septicémies
Proteus mirabilis	Bacilles à Gram négatif	Commensale de l'intestin de l'homme et des animaux	Infections localisées surtout cutanées infections des voies respiratoires, septicémies
Staphylococcus aureus	Cocci a Gram positif	Ubiquitaire dont le réservoir est localisée au sein de la peau et des muqueuses	Intoxications alimentaires, infections cutanées et des muqueuses, septicémies, pneumonies
Bacillus cereus	Bacilles à Gram positif	Ubiquitaire dans le sol, dans l'eau de mer, dans l'eau douce et sur les plantes	Intoxications alimentaires, infections des plaies, méningites, infections du système nerveux central, infections respiratoires
Candida albicans	Petites levures rondes ou ovalaires de 2 à 4 microns, bourgeonnantes, souvent accompagnées de filaments mycéliens ou pseudo-mycéliens	Commensale de la bouche, sur la peau, dans le système digestif et dans la flore vaginale	Candidose sur les muqueuses digestives et gynécologique, candidémie, érythème fessier chez les nouveau-nés, bronchopneumonie et pneumonie, vaginite, balanite et infections profondes

Les souches utilisées proviennent des laboratoires de microbiologie de la faculté des sciences biologiques et agronomiques de l'UMMTO.

III.1. Identification des souches microbiennes

III.1.1. Vérification de la pureté des souches

La pureté des souches microbiennes utilisées a été vérifiée par repiquages successifs des souches bactériennes sur le milieu Mueller Hinton et incubation à 37°C pendant 24 heures.

Le repiquage des souches fongiques a été réalisé sur le milieu Sabouraud et incubation à 25°C pendant 72 heures.

III.1.2. Conservation des souches

Les souches microbiennes testées sont des souches pures conservées dans la gélose TSA à 4°C.

III.1.3. Observation macroscopique

Après le repiquage de chaque souche, une observation à l'œil nu a été effectuée, basée sur les critères morphologiques des colonies tels que l'aspect, la couleur, la texture et l'opacité.

III.1.4. Observation microscopique

Les cellules sont observées à l'état frais, puis colorées au bleu de méthylène, suivies d'une coloration de Gram, afin de déterminer la morphologie, le mode de groupement, et le type de Gram.

L'observation à l'état frais, la coloration au bleu de méthylène et la coloration de Gram sont décrites dans l'annexe no ... (voir annexe).

III.2. Préparation de l'inoculum microbien

Les tests antibactériens sont réalisés à partir des cultures jeunes en phase exponentielle de croissance. Chacune des souches étudiées a été repiquée plusieurs fois sur le milieu TSA et incubée à 37°C afin d'obtenir des cellules jeunes de 16 à 18 heures.

Prélever d'une culture, quelques colonies bien isolées pour chacune des souches à tester et les émulsionner dans des tubes à essai contenant 10 ml d'eau physiologique stérile (NaCl : 0,9 g/l) et agiter pour obtenir des suspensions à une densité optique de 0,08 à 0,1 pour une longueur d'onde de 620 nm, afin d'évaluer la concentration microbienne et l'homogénéité des tapis microbiens.

IV. Evaluation qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne.

IV.1. Test in vitro

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode des puits décrite par BERGHE ET VLIETINCK (1991) ainsi que ISMAIL *et al.* (2008). Cette méthode consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes mis en contact aux différents agents antimicrobiens étudiés.

IV.2. Protocole expérimental

La méthode se résume comme suit

Couler aseptiquement le milieu de culture gélosé (Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures) en surfusion dans des boîtes de Pétri en raison de 20ml par boîte. Laisser refroidir et solidifier.

Ensemencer à partir de l'inoculum microbien standardisé à 10^6 UFC/ml, à l'aide d'un écouvillon stérile toute la surface gélosée en stries serrées et on laisse sécher.

Des puits d'environ 6mm de diamètre ont été confectionnés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile retournée à son extrémité large. A l'intérieur des puits, déposer 50 μ l de chaque échantillon à tester. Les boîtes sont ensuite fermées et laissées diffuser l'agent antimicrobien pendant 30 minutes.

De même, des antibiogrammes de référence pour les bactéries, et un antifongique pour la levure étudiée ont été réalisés afin de servir de témoins positifs pour comparer les résultats. Ainsi, des puits ne contenant que du Di-Méthyle-Sulfoxyde (DMSO) et d'autres avec les différents échantillons comme témoins négatifs. De plus, une boîte de Pétriensemencée non traitée est incubée dans des conditions similaires à celles des boîtes de Pétri traitées.

La lecture est réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C pour les bactéries et 72 heures à 25°C pour les levures. Les diamètres des zones d'inhibition autour des puits sont mesurés à l'aide d'une règle et exprimés en millimètre (mm) (le diamètre du puits (6mm) est inclus).

Selon **PONCE *et al.* (2003)**, la sensibilité des différentes souches vis-à-vis des huiles essentielles étudiées est classée selon le diamètre d'inhibition.

- Non sensible ou résistante, si : $\emptyset < 8$ mm
- Sensible si : $9\text{mm} < \emptyset < 14$ mm
- Très sensible : 15 mm $< \emptyset < 19$ mm
- Extrêmement sensible si : $\emptyset \geq 20$ mm

IV.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF) :

IV.3.1. Détermination de la CMI

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrices. Celle-ci consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (OUSSOU et *al.* 2008 ; DERWICH et *al.* 2010).

IV.3.2. Préparation des dilutions

IV.3.2.1. Dilution des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont diluées dans le DMSO. Le choix de celui-ci comme diluant est basé sur la miscibilité des huiles essentielles à ce dernier et non à l'eau.

Les différentes dilutions préparées sont présentées dans le Tableau 2 :

Tableau V : Les dilutions des huiles essentielles effectuées dans le DMSO

Pourcentage de la dilution (%)	75	50	25	5	1	0,5	0,1
HE / DMSO (µl / ml)	750	500	250	50	10	5	1

IV.3.2.2. Préparation des solutions d'acide citrique

L'acide citrique sous forme solide étant dissous dans le DMSO, nous avons préparé cinq concentrations différentes. Les quantités adéquates d'acide citrique sous forme solide ont été pesées à l'aide d'une balance précise, puis homogénéisées au DMSO afin d'obtenir les concentrations suivantes (Tableau 3):

Tableau VI : Les dilutions d'acide citrique préparées :

Pourcentage de la dilution (%)	15	10	6	5	4	3	1
Acide citrique/ DMSO (g / 100 ml)	15	10	6	5	4	3	1

IV.3.2. Détermination de la CMB

La détermination des concentrations minimales bactéricides est réalisée par un prélèvement, à l'aide d'une pipette Pasteur, dans les zones d'inhibition (ne présente aucune culture visible). Chaque prélèvement est, ensuite, repiqué en stries sur le milieu MH.

La lecture est réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C. L'absence de colonies sur la gélose indique que la concentration en agent antimicrobien préalablement utilisée représente la CMB, et l'apparition de celles-ci indique que la concentration en agent antimicrobien n'est que la CMI.

V. Combinaisons d'agents antimicrobiens

D'après PIBIRI (2005), les effets des combinaisons d'agents antimicrobiens sont définis selon quatre interactions possibles : indifférence, addition, synergie et antagonisme.

Ces tests consistent à combiner volume à volume deux substances antimicrobiennes à dilutions données par la méthode des puits selon les CMI obtenues par celle-ci afin d'obtenir des concentrations minimales sub-inhibitrices. Chacun de ces agents a été dilué à différentes concentrations.

Les différentes combinaisons d'agents antimicrobiens consistent à fusionner :

1. L'huile de thym avec l'acide citrique
2. L'huile de laurier avec l'acide citrique
3. L'huile de thym avec l'huile de laurier

A l'aide d'une micropipette, les puits ont été remplis de 50 μ l du mélange de deux agents antimicrobiens à partir d'un eppendorf où sont mélangés les différents agents (25 μ l de chacun). Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et comparés à ceux des agents antimicrobiens testés seuls préalablement.

Résultats et discussion

I. Vérification de la pureté des souches

I.1. Observation microscopique à l'état frais

Les résultats de cette observation sont résumés dans le tableau 4:

Tableau VII : Résultats de l'observation microscopique à l'état frais et après coloration au bleu de méthylène des souches bactériennes étudiées.

Souche	Morphologie	Mode de groupement	Présence d'autres cellules
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilles	En amas	Non
<i>Escherichia coli</i>	Ovales, cocobacilles	Seules, ou en amas dispersées	Non
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacilles	En amas, grappes	Non
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilles,	Chainettes diploïdes	Non
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coques	Grappes isolées	Non

Les résultats des observations microscopiques effectuées ne révèlent aucun doute sur la nature et la pureté des souches utilisées dans les tests.

II. Coloration de Gram

Les résultats de la coloration de Gram effectuée sur les différentes souches bactériennes étudiées sont présentés dans la figure 1:

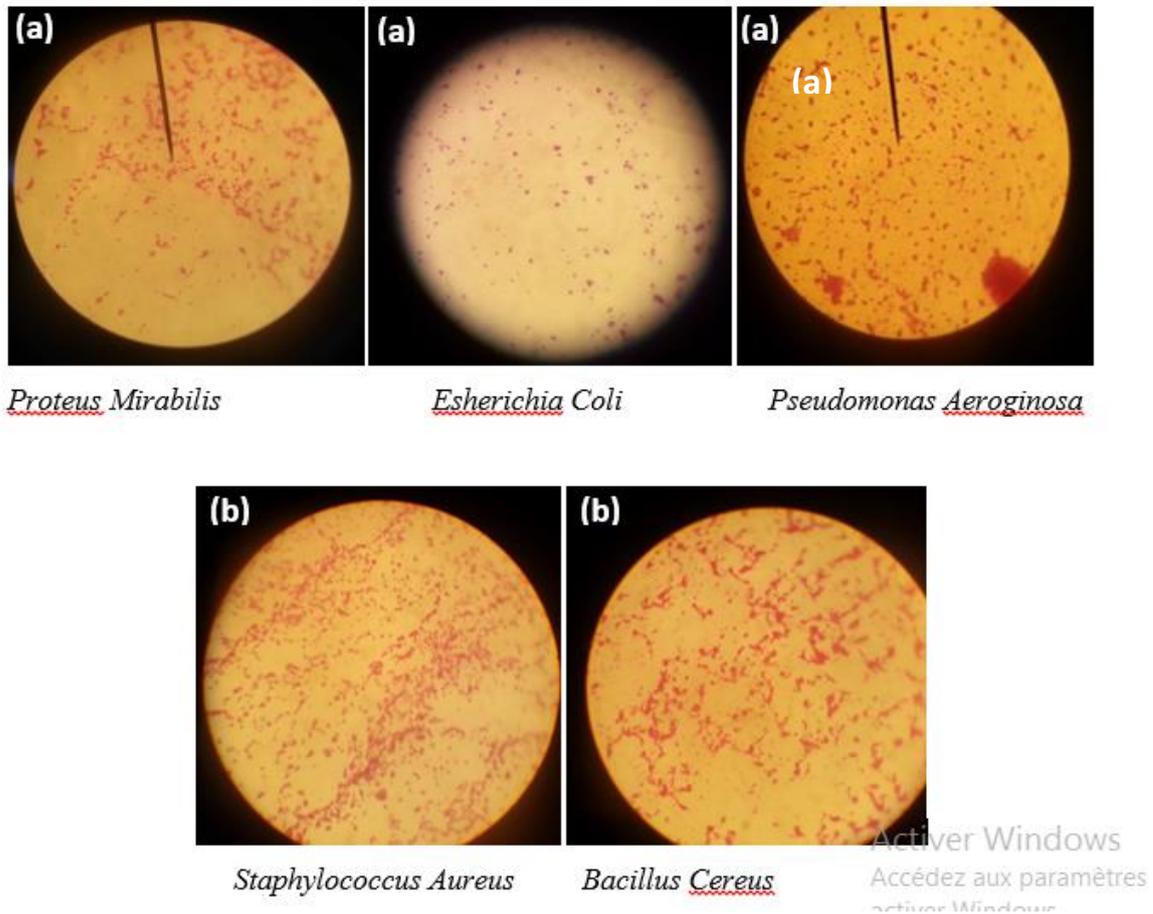


Figure 10 : Photos montrant les souches bactériennes après coloration de Gram, observées au microscope optique (G×1000 à immersion). (a) : bactéries à Gram négatif ; (b) : bactéries à Gram positif

II. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne se traduit *in vitro* par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des puits imprégnés de l'agent antimicrobien étudié sur culture microbienne menée dans une boîte de Pétri. Le diamètre des zones d'inhibition autour de ces puits détermine l'action antimicrobienne.

II.1. Résultats des témoins

Afin de s'assurer que le DMSO utilisé comme diluant n'exerce aucun effet additionnel interférant dans l'activité des huiles essentielles à étudier, nous avons testé le DMSO (témoin

négatif). Les résultats obtenus après incubation ont permis de constater que les boîtes de Pétri contenant des puits imprégnés de DMSO ne montrent aucune zone d'inhibition de la croissance de *E.coli*, ce qui indique donc l'absence totale de l'effet inhibiteur de celui-ci interférant dans l'action des différents agents antimicrobiens, Ainsi, l'effet antimicrobien additionnel éventuel du DMSO se trouvant dans les échantillons serait nul.

Afin de valider nos tests, un antibiotique de référence (Imipenème) a été testé sur *E.coli* comme témoin positif.



Figure 11 : Effet du DMSO et de l'antibiotique sur Escherichia Coli.

II.2. Effet antibactérien des agents testés

II.2.1.Effet de l'huile essentielle de thym à linalol sur *E. coli*

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym sur *E. coli* sont illustrés dans la figure 12.

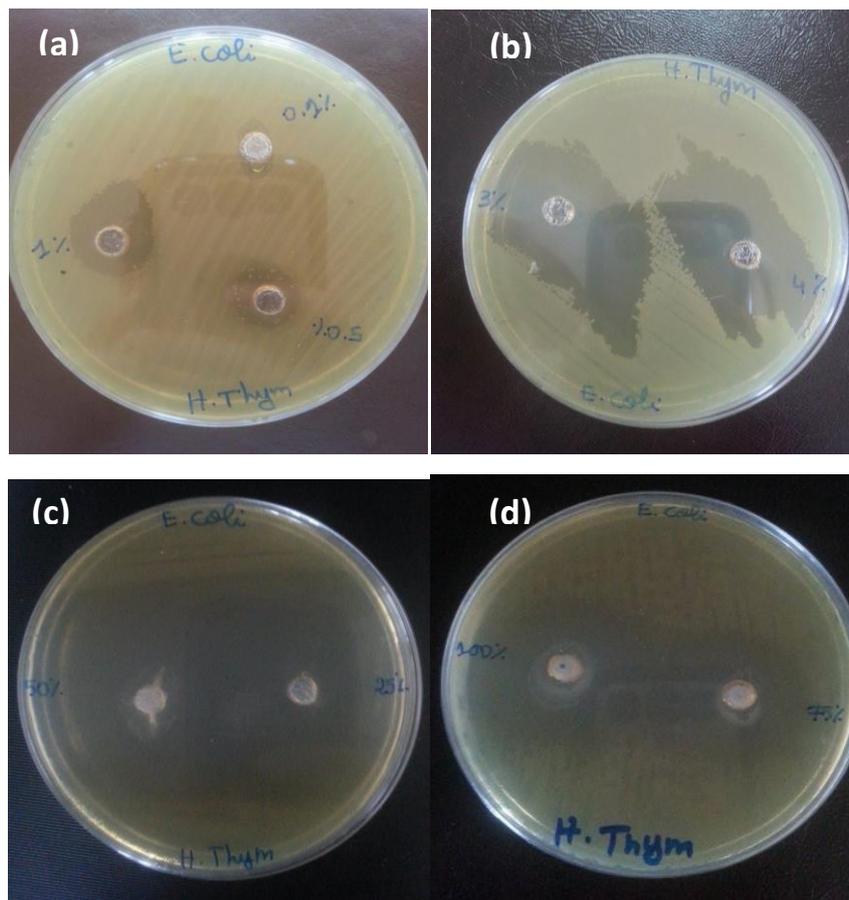


Figure 12 : Photos montrant l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de thym sur *E. coli*. (a) : 0,1%, 0,5%, 1%. (b) : 3%, 4%. (c) :25%, 50%. (d) :75%, 100%.

L'activité antimicrobienne est exprimée par le diamètre de zone d'inhibition en (mm) en fonction de la concentration de l'huile de thym, Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau VIII : Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la dose de l'huile de thym utilisée :

Dose de l'huile de Thym	0,1%	0,5%	1%	5%
Diamètre d'inhibition en (mm)	8	14	16	25

II.2.2. Effet de l'huile essentielle de Laurier noble sur *Escherichia-Coli* :

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Laurier sur *Escherichia-Coli* sont illustrés dans les figures suivantes.

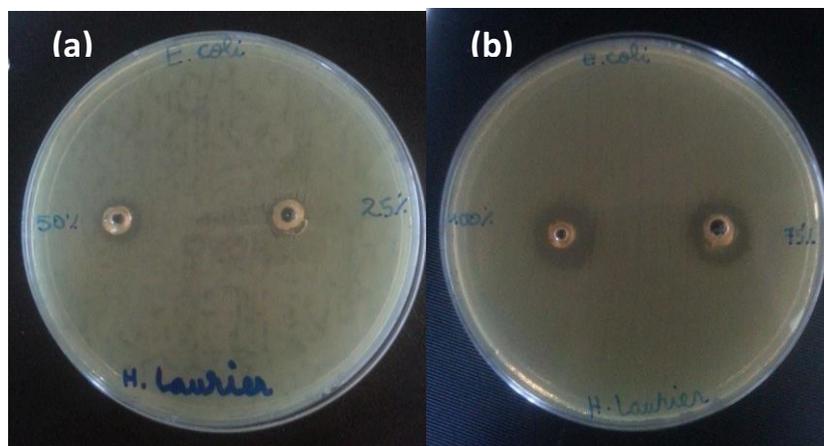


Figure 13 : Photos montrant l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Laurier sur *E. coli*. (a) :25%, 50%.(b) :75%, 50%.

L'activité antimicrobienne est exprimée par le diamètre de zone d'inhibition en (mm) en fonction de la concentration de l'huile de Laurier, Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau IX : Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la dose de l'huile de Laurier utilisée :

Dose de l'huile de Laurier	0,1%	0,5%	1%	5%
Diamètre d'inhibition en (mm)	8	14	16	25

II.2.3. Effet de l'acide citrique sur *Escherichia-Coli* :

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'acide citrique sur *E. coli* sont illustrés dans la figure 14.

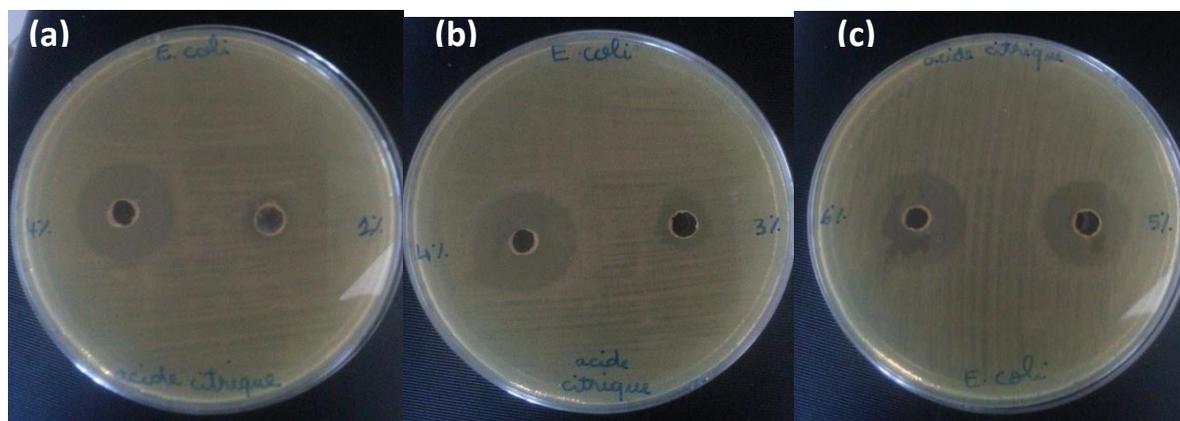


Figure 14 : Photos montrant l'activité antimicrobienne de l'acide citrique sur *E. coli*.

. (a) :1%, 4%. (b) :3%, 4%. (c) :5%, 6%.

L'activité antimicrobienne est exprimée par le diamètre de zone d'inhibition en (mm) en fonction de la concentration de l'acide citrique, Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Tableau X : Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la dose de l'acide citrique utilisée :

Dose de l'acide citrique	1%	3%	4%	5%	6%
Diamètre d'inhibition en (mm)	8	12	24	26	28

II.3. Détermination des valeurs des CMI (concentrations minimales inhibitrices)

Les valeurs des CMI obtenues correspondant aux différents agents antimicrobiens testés sur *Escherichia Coli*. La détermination de celles-ci est basée sur l'observation de la présence ou absence d'une croissance microbienne autour du puits imprégné de l'agent antimicrobien, étant donné que la CMI est la plus petite concentration du produit testé qui présente une zone d'inhibition significative. Les résultats sont rapportés dans le tableau 8.

Tableau XI : valeurs des CMI obtenues pour chaque agent antimicrobien testé sur E Coli

Agent antimicrobien	CMI
Huile essentielle de Thym	0,5%
Huile essentielle de Laurier	50%
Acide citrique	3%

Les résultats de la détermination des CMI montrent une variabilité dans la sensibilité d'*E. Coli* vis-à-vis des différents agents antimicrobiens. Plus la valeur de la CMI est faible plus l'activité antimicrobienne de l'agent testé est meilleure.

La meilleure CMI (CMI=0,5%) a été obtenue avec l'huile essentielle du thym, cela signifie que cette huile a un pouvoir inhibiteur très puissant sur la souche bactérienne étudiée, comparativement aux autres agents antimicrobiens testés.

II.4. Détermination des CMB (concentrations minimales bactéricides) obtenues pour les différents agents antimicrobiens testés sur *E. coli*

Les valeurs des CMB sont déterminées à partir des résultats de repiquage des souches prélevées à partir des boîtes qui ont présenté une zone d'inhibition lors de l'observation des résultats des CMI.

La figure 15 illustre les résultats de détermination des CMB des agents antimicrobiens étudiés.

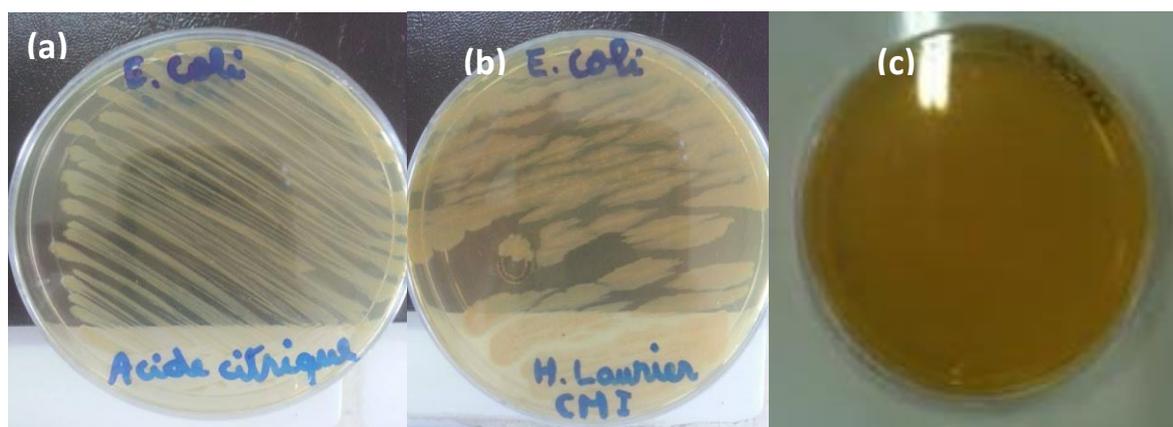


Figure 15 : Photos montrant les CMI des agents antimicrobiens testés sur *E. coli*

(a): Acide critique, (b): HE. Laurier, (c): HE. Thym

La meilleure CMB a été obtenue avec l'huile de thym, elle est égale à la CMI (0,5%) Selon DEGRYSE et *al.*(2008), la différence d'activité biologique entre les huiles essentielles utilisées est due à la différence de leur composition.

III. Combinaisons d'agents antimicrobiens

Les huiles essentielles peuvent être utilisées comme agents antimicrobiens contre des espèces pathogènes pour l'homme. Afin de réduire la dose efficace de ces agents, celles-ci peuvent être combinées avec d'autres agents, ce qui peut produire un effet synergique ou additionnel (HORVATH et *al.*, 2016).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité des huiles essentielles végétales en combinaison à deux et entre les huiles et l'acide citrique. Les mélanges obtenus sont testés par la méthode de diffusion en puits sur la souche *E.coli*.

III.1.Effet combiné de l'huile essentielle de thym à linalol et l'acide citrique

Le tableau 9 regroupe les résultats de l'effet de la combinaison de l'HE de thym et de l'acide citrique sur *E.coli*.

Tableau XII : Effet de combinaison de l'HE de thym et de l'acide citrique sur la croissance de *E. coli*.

Ac.citrique % HE.Thym%	5% Ø=20	4% Ø=24	3% Ø=12	1% Ø=08
5% Ø=25	30	20	25	25
1% Ø=16	16	14	14	14
0,5% Ø=14	18	15	14	15
0,1% Ø=08	8	10	12	15

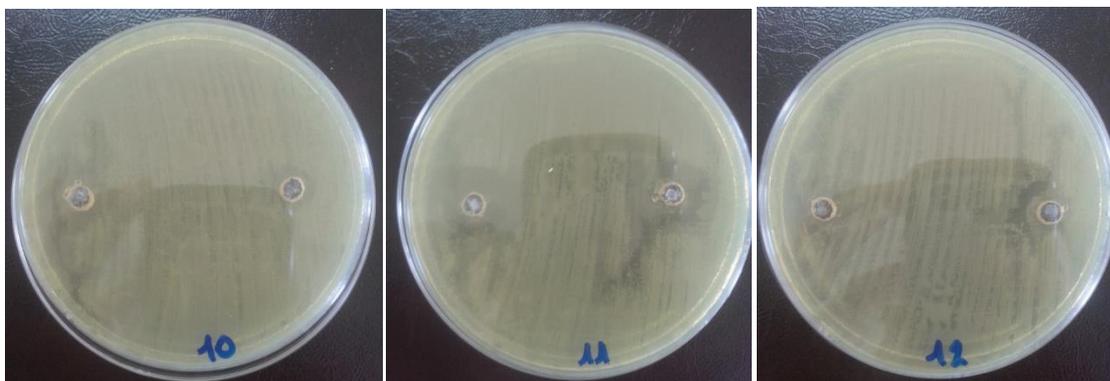
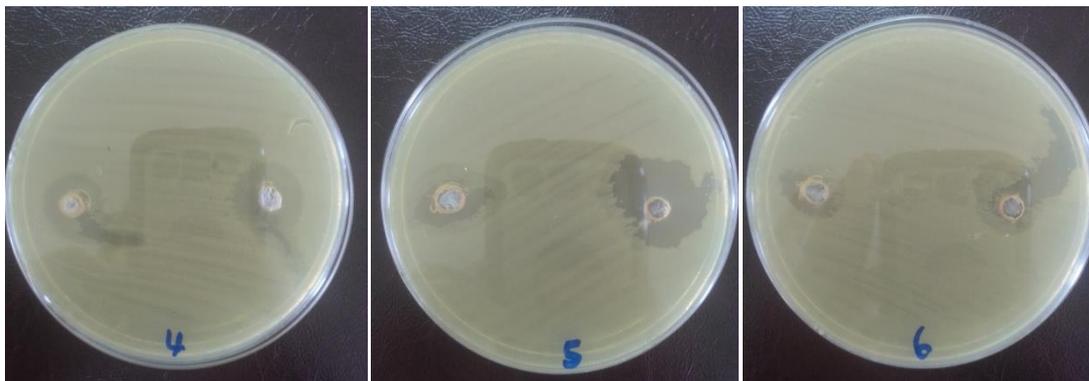
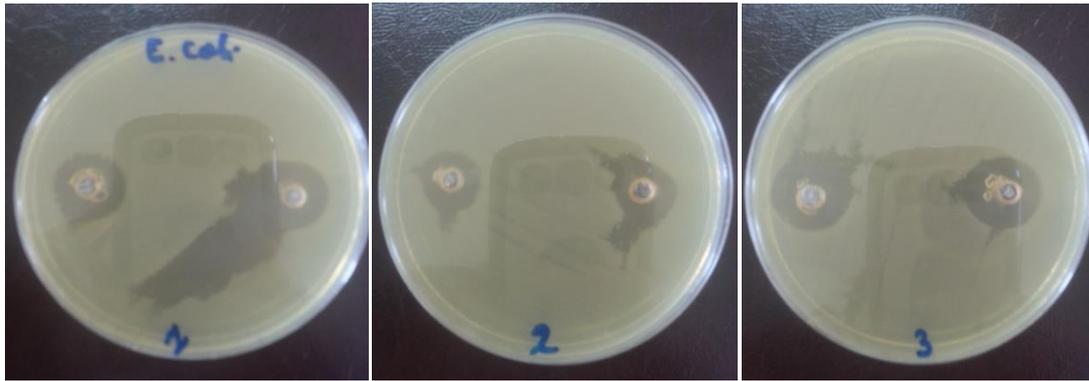
Les résultats du tableau 9 montrent que la combinaison entre l'huile essentielle de thym à linalol et l'acide citrique exerce des effets inhibiteurs variables sur la croissance d'*E. Coli*.

Les diamètres d'inhibition obtenus pour *E.coli* sont compris entre 30mm, valeur maximale résultant de la combinaison à des concentrations sub-inhibitrices maximales : Huile de Thym 5% et acide citrique 5%, et 8mm valeur minimale obtenue avec les concentrations les plus faibles (H.T 0,1% et 5% d'acide citrique).

Selon ces résultats, les bactéries se sont montrées sensibles pour la majorité des concentrations testées, donc l'effet antibactérien de la combinaison est plus important en le comparant à l'effet de ces agents testés séparément.

Lors de la combinaison des substances antimicrobiennes, trois effets sont à distinguer : addition, antagonisme ou synergie (FLEIRO, 2011). Nous avons obtenu une inhibition totale à des concentrations (sub-inhibitrices) inférieures aux CMI des agents antimicrobiens testés, ce qui indique probablement l'effet synergique.

Les effets inhibiteurs de la croissance bactérienne observés sont illustrés dans la figure 16.



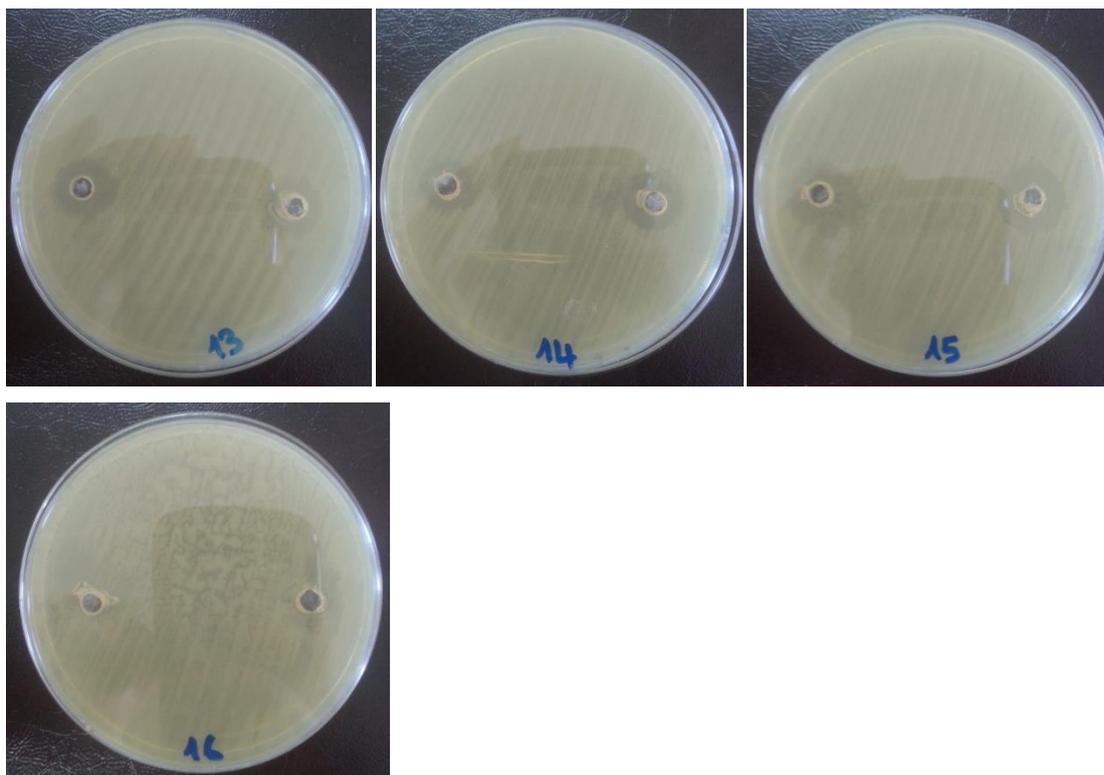


Figure 16 : Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison de l'huile essentielle de Thym avec l'acide citrique.

- 1) H.Thym 5%+Ac.citrique 5%.
- 2) H.Thym 5%+Ac.citrique 4%.
- 3) H.Thym 5%+Ac.citrique 3%
- 4) H.Thym 5%+Ac.citrique 1%
- 5) H.Thym 1%+Ac.citrique 5%
- 6) H.Thym 1%+Ac.citrique 4%
- 7) H.Thym 1%+Ac.citrique 3%
- 8) H.Thym 1%+Ac.citrique 1%
- 9) H.Thym 0,5%+Ac.citrique 5%
- 10) H.Thym 0,5%+Ac.citrique 4%
- 11) H.Thym 0,5%+Ac.citrique 3%
- 12) H.Thym 0,5%+Ac.citrique 1%
- 13) H.Thym 0,1%+Ac.citrique 5%
- 14) H.Thym 0,1%+Ac.citrique 4%
- 15) H.Thym 0,1%+Ac.citrique 3%
- 16) H.Thym 0,1%+Ac.citrique 1%

III.2. Effet combiné de l'huile essentielle de laurier noble et de l'acide citrique

Le tableau 10 regroupe les résultats de l'effet de la combinaison de l'HE de laurier et de l'acide citrique sur *E.coli*.

Tableau XIII : Résultats de combinaison de l'HE de Laurier et de l'acide citrique sur *E.coli*.

Ac.citrique % HE.Laurier%	5% Ø=20	4% Ø=24	3% Ø=12	1% Ø=08
100% Ø=18	17	16	20	16
75% Ø=14	22	15	16	14
50% Ø=10	15	15	20	14
25% Ø=08	15	15	17	11

Les résultats du tableau 10 montrent que la combinaison entre l'huile essentielle de laurier à noble et l'acide citrique exerce des effets inhibiteurs variables sur la croissance de *E.coli*.

En effet, les résultats indiquent des zones d'inhibition totales à de fortes concentrations comprises entre 100% et 50% d'huile de laurier versus 5% et 3 % d'acide citrique. Au-delà de ces valeurs, les zones d'inhibition sont moins importantes, elles sont décroissantes en fonction de la baisse de concentration d'huile essentielle et d'acide citrique. Cependant, les diamètres d'inhibition restent supérieurs à 11mm pour toutes les concentrations testées, ce qui affirme que l'effet combiné de l'huile essentielle et de l'acide citrique est très considérable sur *E.coli*. L'effet de ces deux agents sur la croissance de cette souche est plus important que l'effet exercé individuellement.

Néanmoins, les résultats obtenus permettent de relever une interaction positive entre l'huile essentielle de laurier et l'acide citrique à de différentes concentrations, l'un a exercé un effet additionnel ou a renforcé l'effet de l'autre agent antimicrobien. Cette observation est similaire à celle obtenue avec la combinaison précédente.

Les résultats obtenus dans le tableau précédent sont illustrés dans la figure suivante :





Figure 17 : Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison de l'huile essentielle de Laurier avec l'acide citrique.

- 1) H.Laurier 100%+Ac.citrique 5%.
- 2) H.Laurier 100%+Ac.citrique 4%.
- 3) H.Laurier 100%+Ac.citrique3%
- 4) H.Laurier 100%+Ac.citrique 1%
- 5) H.Laurier 50%+Ac.citrique 5%
- 6) H.Laurier 50%+Ac.citrique 4%
- 7) H.Laurier 50%+Ac.citrique 3%
- 8) H.Laurier 50%+Ac.citrique 1%
- 9) H.Laurier 25%+Ac.citrique 5%
- 10) H.Laurier 25%+Ac.citrique 4%
- 11) H.Laurier 25%+Ac.citrique 3%
- 12) H.Laurier 25%+Ac.citrique 1%
- 13) H.Laurier 10%+Ac.citrique 5%
- 14) H.Laurier 10%+Ac.citrique 4%
- 15) H.Laurier 10%+Ac.citrique 3%
- 16) H.Laurier 10%+Ac.citrique 1%

III.3.Combinaison entre deux huiles essentielles

Nous avons examiné l'activité antimicrobienne des combinaisons HE/HE avec la méthode de diffusion en puits en variant les concentrations de chaque huile essentielle pour déterminer la nature de l'effet.

Effet combiné de l'huile essentielle de thym à linalol et l'huile essentielle de laurier noble

Le tableau 11 regroupe les résultats de l'effet de la combinaison de l'huile essentielle du thym avec l'huile essentielle de laurier sur *E.coli*.

Tableau XIV : Résultats de combinaison de l'huile essentielle du thym avec l'huile essentielle de laurier sur *E.coli*.

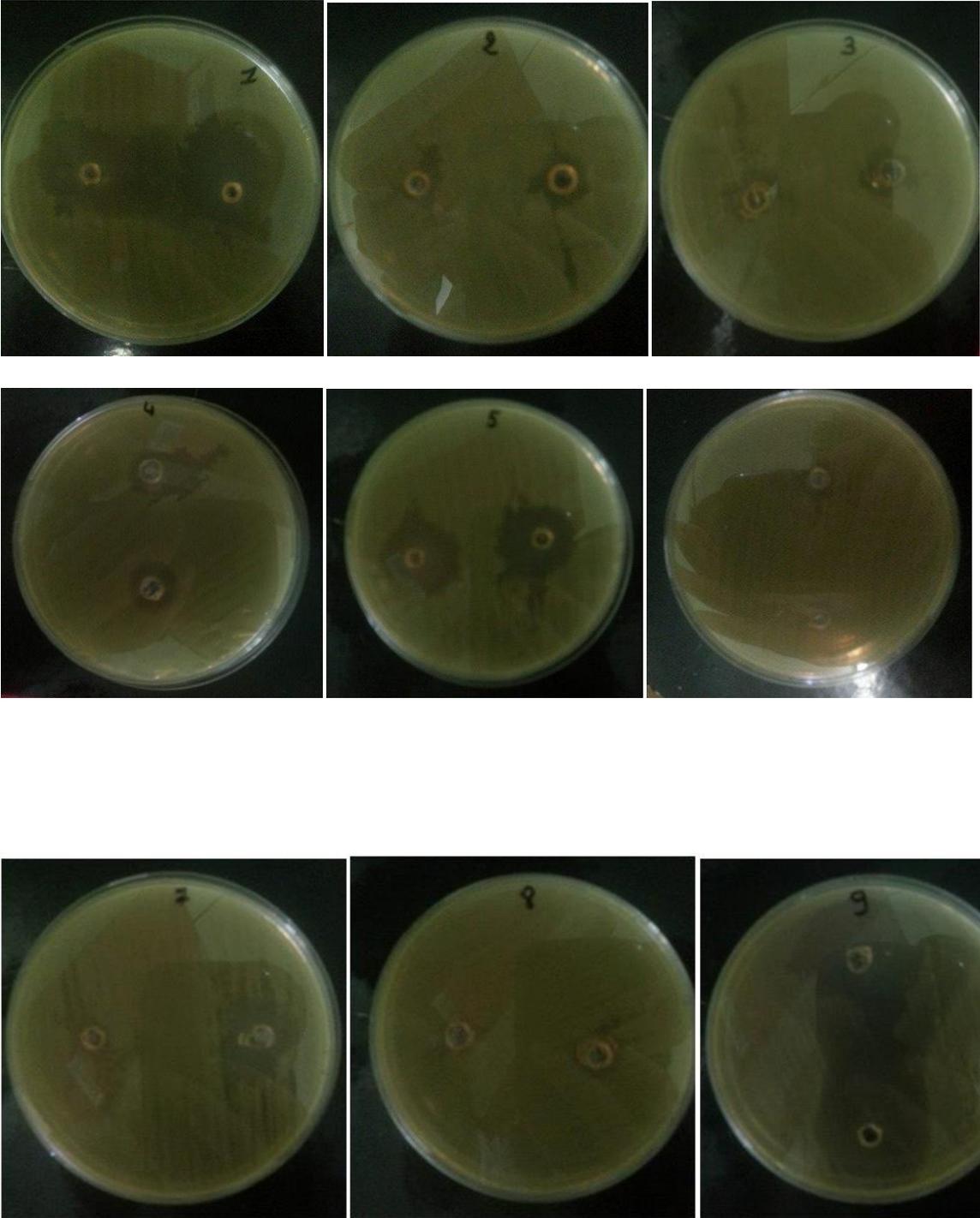
HE.Thym % HE.Laurier%	100% Ø=35	1% Ø=16	0,5% Ø=14	0,1% Ø=08
100% Ø=18	27	14	14	13
75% Ø=14	25	15	24	12
50% Ø=10	35	25	30	15
25% Ø=08	15	35	15	17

Les résultats du tableau 11 montrent que la combinaison entre l'huile essentielle de laurier noble et du thym à linalol exerce des effets inhibiteurs variables sur la croissance d'*E.coli*.

Il ressort du tableau que la combinaison des deux huiles essentielles du Thym à linalol et de Laurier noble a exercé un effet inhibiteur contre *E.coli* à tous les stades de concentrations et nous avons diminué ces dernières jusqu'à 25% pour l'huile de Laurier et à 0,1 % pour l'huile de Thym, sachant que ces valeurs sont inférieures à leur CMI. Ceci a conduit à un effet synergique dû probablement aux interactions chimiques entre les composants majeurs de ces deux huiles.

Ces résultats sont similaires à ceux publiés par (MOON et *al.*,2016) qui expliquaient l'effet antibactérien du mélange de thymol avec le carvacrol contre *E.coli* qui agit sur la paroi bactérienne des Gram -. De même (HORVATH et *al.*2016) ont étudié l'effet synergique de la combinaison des huiles essentielles de : Thym, Cannelle, Clou de girofle et Menthe verte contre les levures et les moisissures et ils ont pu diminuer leurs doses par ces associations. En outre l'effet synergique apparaît aussi entre les huiles essentielles de l'origan mexicain, moutarde (*Brassicinagra*), et le thym qui ont été évalués en combinaisons binaires contre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, et *Salmonella enteritidis* (REYES-JURADO.2016).

Les zones d'inhibition sont illustrées dans la figure 18.



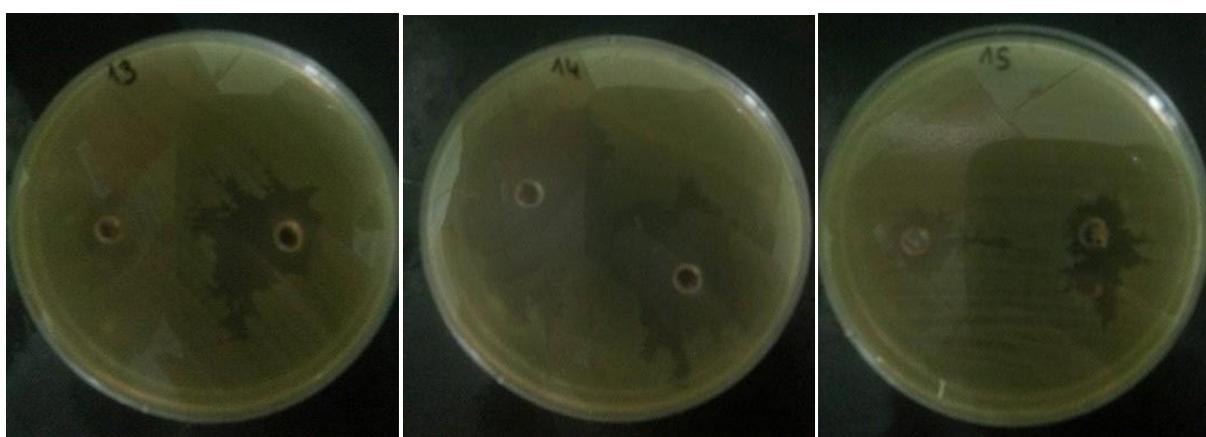


Figure 18 : Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison de l'huile essentielle de thym avec l'huile essentielle de laurier.

- 1) H.Thym 100%+ H.Laurier 100%.
- 2) H.Thym 1%+ H.Laurier 100%.
- 3) H.Thym 0,5%+ H.Laurier 100%
- 4) H.Thym 0,1%+ H.Laurier 100%.
- 5) H.Thym 100%+ H.Laurier 75%.
- 6) H.Thym 1%+ H.Laurier 75%
- 7) H.Thym0,5%+ H.Laurier 75%.
- 8) H.Thym 0,1%+ H.Laurier 75%.
- 9) H.Thym 100%+ H.Laurier 50%
- 10) H.Thym 1%+ H.Laurier 50%.
- 11) H.Thym 0,5%+ H.Laurier 50%.
- 12) H.Thym 0,1%+ H.Laurier 50%
- 13) H.Thym 100%+ H.Laurier 25%.
- 14) H.Thym 1%+ H.Laurier 25%.
- 15) H.Thym 0,5%+ H.Laurier 25%
- 16) H.Thym 0,1%+ H.Laurier 25%

Conclusion et perspectives :

Cette étude avait pour objectif principal de déterminer l'effet antibactérien des huiles essentielles de thym et du laurier testés "*in vitro*» individuellement et en combinaison. Les résultats obtenus ont permis de révéler l'activité antibactérienne des huiles essentielles, ceci laisse suggérer la possibilité de leur utilisation comme agents antimicrobiens efficaces dans divers produits.

L'étude de l'activité antimicrobienne de ces huiles essentielles et de leur synergie vise à réduire leur concentration lors de leur incorporation dans divers produits principalement les produits agroalimentaires, ceci permettra d'éviter ou réduire leur incidence défavorable sur la qualité (sensorielle ou visuelle) du produit traité, ainsi que leur coût.

Ces huiles essentielles pourraient être utilisées aussi bien dans la conserverie afin de substituer des conservateurs chimiques par ces huiles naturelles, que dans la filière des viandes et produits de pêche en vue de prolonger la durée de conservation des produits à l'état frais. Il est de même pour les produits marinés, où les plantes de laurier et thym sont utilisées dans diverses recettes traditionnelles, l'utilisation de ces huiles essentielles au niveau industriel est tout à fait envisageable.

Toutefois, les résultats obtenus "*in vitro*" ne constituent qu'une première étape de recherche, ils doivent être validés par des études menées sur des matrices alimentaires avant de les appliquer à l'échelle industrielle.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

A

1. AFSSAPS (Association Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé) (2008). Recommandation relatives aux critères de qualité des huiles essentielles.
2. ALI B., AL-WABEL N A., SHAMS S., AHAMAD A., KHAN S A., ANWAR F. (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pac J Trop Biomed*, **5**(8), 601–611.
3. ANONYME-1. (2017). CERTIFICAT D'ANALYSES / CERTIFICATE OF ANALYSIS : Thym linalol / Thyme linalool -Docteur valnet- Principaux constituants biochimiques. Laboratoire d'aromathérapie casbionate.
4. ANONYME-2. (2017). Principaux constituants biochimiques de l'huile de laurier noble. Laboratoire AeL création –Herbes et Tradition-. <http://www.herbes-et-traditions.fr/huiles-essentielles-et-synergies/475-laurier-noble-bio.html#idTab1>.
5. ARAB K., BOUCHENAK O., YAHIAOUI K. (2014). Etude physico-chimique et évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Sarriette des montagnes vis-à-vis des bactéries isolées des infections urinaires. *Revue Agriculture*, **07**, 12 – 19.
6. ARUOMA O., (1998). Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *JAOCS*. **75**, 200- 212.

B

7. BAKKALIF., AVERBECK S., AVERBECK D., IDAOMAR M. (2004). Biological effects of essential oils – A review *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 446–475.
8. BARATTA MT, DORMAN HJD, DEAN SG, FIGUEIREDO C, BARRORO JG, RUBERTO G. (2011). Antimicrobial and antioxidant property of some commercial essential oils. *Flavour Fragr J*, **13**. 235-44.
9. BARATTA MT., DORMAN HJD., DEAN SG., BRONDI DM., RUBERTO G. (1998). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J Essent Oil Res* **10**, 618-27.
10. BAYALA B., BASSOLE I.H., SCIFO R., GNOULA C., MOREL L., LOBACCARO J.M., SIMPORE J. (2014). Anticancer activity of essential oils and their chemical components- A review. *Am. J. Cancer Res*, **19**, 591–607.
11. BELOUED A. (2005). *Plantes médicinales d'Algérie - 5ème édition*. Alger. Algérie.

12. BENNADJA S., AIT KAKI Y T., DJAHOUDI A1., HADEF Y., CHEFROUR A. (2013). Antibiotic Activity of the Essential Oil of Laurel (*Laurus nobilis*) on Eight Bacterial Strains Journal of Life Sciences, 7, 814-819.
13. BILLERBECK V G., (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques Phytothérapie, 5, 249–253.
14. BOEHM K., BÜSSING A., OSTERMANN T. (2012). Aromatherapy as an adjuvant treatment in cancer care - a descriptive systematic review. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med, 9, 503–518.
15. BOUHDID S., IDAOMAR M., ZHIRI A., BOUHDID D., SKALI N S., ABRINI J. (2006). Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès Intrntional de biochimies, Agadir. 324-327.
16. BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
17. BUCHBAUER G., JIROVETZ L. (1993). Aromatherapie-Definition und discussion uber den stand der forschung (German). Arstezeitschrift fur Naturheilverfahren, 34, 259–264.
18. BUCHBAUER, G., 2010. Biological activities of essential oils. In: BASER K.H.C., BUCHBAUER G. (Eds.). Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. CRC Press, Boca Raton. 235–280
19. BUCKLE J. (2015). Clinical Aromatherapy (Third Edition) Essential Oils in Healthcare. Elsevier. UK.
20. BURT S. (2004). Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in food, a review. International.Journal. of Food Microbiology. 94, 223-253.

C

21. CAILLET S., LACROIX M. (2007). Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut. Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).
22. CARSON C F., MEE B J., RILEY T. (2002). Mechanism of Action of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil on Staphylococcus aureus Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1914–1920
23. CONNER D E. (1993). Naturally occuring compounds. In : Davidson P.M. and Branen A.L(Eds). Antimicrobials in foods, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc.,New york, 441-468.

24. COOK CM., LANARAS T. (2016). Essential Oils: Isolation, Production and Uses In : CABALLERO B., FINGLAS M. FIDEL TOLDRA ENCYCLOPEDIA OF FOOD AND HEALTH (2) Academic Press. Elsevier. UK.
25. COSKUN S., GIRISGIN O., KÜRKCÜOĞLU M., MALYER H., GIRISGIN A O., KIRIMER N., BASER K H. (2008). Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). *Parasitol Res*, 103, 259–261.
26. COUIC-MARINIER F. (2013). *Actualités pharmaceutiques* n° 525. Elsevier Masson. 22-25.
27. COX SD., MANN CM., MARKHAM JL. (2001). Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol*, 91, 492–497.

D

28. DEGRYSE A-C., DELPHA I., VOINIER M A. (2008). Risques et Bénéfices Possibles des Huiles Essentielles. Atelier santé environnement-IGS-EHESP, France.
29. DELAQUIS P J., STANICH K., GIRARD B., MAZZA G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74, 101– 109.
30. DERWICH E., BENZIANE Z., BOUKIR A. (2010). Chemical Composition and *In Vitro* Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Cedrus atlantica*. *J. Agric. Biol.* 12, (3) ,381-385.
31. DHIFI W., BELLILI S., JAZI S., BAHLOUL N., MNIF W. 2016. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* (3), 1-16.
32. DORMAN HJ., DEANS SG. (2000). Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308-316.

F

33. FALEIRO M L. (2011). The Mode of Antibacterial Action of Essential Oils. IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre for Molecular and Structural Biomedicine, Faculty of Science and Technology, University of Algarve. Portugal
34. FIGUEREDO G. (2007). Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal - Clermont Ferrand II, France.
35. FISHER K., PHILLIPS C. (2009). In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *British journal of biomedical science*, 66, (4), 180-185.

G

36. GROSJEAN N. (2015), les huiles essentielles. 2eme Edition. Eyrolles. Paris.
37. GUILLEN M D., MANZANOS M J. (1998). Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris* L. plqnt. *Food chemistry*, 63 (3), 373-383
38. GUINOISEAU E. (2011). Molécules antibacteriennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse doctorat. Université de Corse-Pasquale Paoli. Corse. France.

H

39. HAMMICHE V. (2014). Traitement de la toux à travers la pharmacopée traditionnelle kabyle Phytothérapie. Lavoisier
40. HARRIS B. (2010). Phytotherapeutic uses of essential oils. In: BASER K.H.C., BUCHBAUER G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, 315–352.
41. HOAREAU L., DA SILVA EJ. (1999). Medicinal plants : a re-emerging health aid. *Electr. J. Biotechnol.* 2: 56-70.
42. HORVATH G JENEI J T., VAGVÖLGYI C., BÖSZÖRMENYI A., KRISCH J. (2016). EFFECTS OF ESSENTIAL OIL COMBINATIONS ON PATHOGENIC YEASTS AND MOULDS *Acta Biologica Hungarica* 67(2), 205–214.
43. HUDAIB M., SPERONI E., PIETRA A. M. D., CARVIN V. (2002) GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during vegetative cycle. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29,691-700
44. HUSSEIN G., MIYASHIRO H., NAKAMURA N., HATTORI M., KAKIUCHI N., SHIMOTOHNO K. (2000). Inhibitory effects of Sudanese medical plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease. *Phytother Res*, 14, 510–516.
45. HYLDGAARD M., MYGIND T., MEYER R L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* (3), 1-24.

I

46. IMDORF A., BOGDANOV S., KILCHENMANN V., BERGER T. (2006) The acaricidal effect of essential oils from thyme, salvia and hyssops plants (from left to right) have been tested against *Varroa destructor*. *Alp science*, Nr. 495. 18p.
47. INOUYE, S. ABE. (2007). Nouvelle approche de l'Aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie* (1), 2–4

48. ISMAIL H., LEMRISS S., BEN AOUN Z., MHADHEBI L., DELLAI A., KACEM Y., BOIRON P. and BOURAOU A. (2008). Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean Sea cucumber. *Holothuria polii*. 18 (1), 23-26.
49. ISMAN M B., MACHIAL C M. (2006). Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization . Rai and Carpinella (eds.)Naturally Occuring Bioactive Compounds, 29-44.
50. ISO. (2014b). Matières premières aromatiques naturelles - vocabulaire - matières premières aromatiques d'origine naturelle. ISO 9235, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland,.

J

51. JANSSEN AM., SCHEFFER JJ., BAERHEIM SVENDSEN A. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Med*, 53, 395–398.
52. JANSSEN M.A., SCHEFFER J.J.C., PARHAN-VAN ATTEN A.W., SVENDSEN, A.B. (1988). Screening of some essential oils for their activities on dermatophytes. *Pharmaceutische Weekblad (Scientific Edition)*, 10, 277–280.
53. JOUAULT S. (2012). La quantité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse doctorat. Lorraine, Canada.

K

54. KALOUSTIAN .J et HADJI-MINAGLOU F. (2013). La Connaissance des Huiles Essentielles : Qualitologie et Aromathérapie : Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Collection Phytothérapie Pratique. Springer-Verlag. Paris.
55. KALOUSTIAN J., CHEVALIER J., MIKAIL C., MARTINO M., ABOU L., VERGNES M-F. (2008). Étude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne, *Phytothérapie*, 160-164.
56. KATO T., LIJIMA H., ISHIHARA K., KANEK T., HIRAI K., NAITO Y & OKUDA K. Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. *Bull. Tokyo. Dent. Coll*, 31(4), 301-307.
57. KETTENRING M M., GEEGANAGE M V. (2010). Aroma-vital cuisine. In : BASER K.H.C., BUCHBAUER, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, 863–880.
58. KILIC A., HAFIZOGLU H., KOLLMANNSBERGER H., NITZ S. (2004). Volatile constituents and key odorants in leaves, buds, flowers and fruits of *laurus nobilis* L.-*J Agric. Food Chem*, 52, 1601- 1606.

59. KIM N-S., LEE D-S. (2002). Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 982, 31–47.
60. KOH K J., PEARCE A L., MARSHMAN G., J.FINLAY-JONES J., H.HART P. (2002). Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *British Journal of Dermatology*, 147, 1212–1217.
61. KURITA N., MIYAJI M., KURANE R., TAKAHARA Y. 1981. Antifungal Activity of Components of Essential Oils. *Agric. Biol. Chem*, 45(4), 945-953.
62. KUROKAWA M., HOZUMI T., BASNET P. (1998). Purification and characterization of eugenin as an anti-herpes virus compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*. *J Pharmacol Exp Ther*, 284, 728–735.

L

63. LAHLOU M. 2004. Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential oil. *Phytotherapy research*, 18, 435–448
64. LAMAMRA M. 2007. Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula* (L.) Parl. et de *Filipendula hexapetala* Gibb. Mémoire Magister. Université Ferhat Abbas. Sétif. Algérie.

M

65. MANSARD M. (2016) Le camphrier : étude botanique, chimique et biologique de ses huiles essentielles. Thèse Doctorat. Université Lorraine. Lorraine. Canada.
66. MIGUEL M G. (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review *Molecules*, 15, 9252-9287.
67. MOON H., RHEE M S. (2016). Synergism between carvacrol or thymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact *International Journal of Food Microbiology* 217 1143-1156.

N

68. NESTOR BASSOLE H I., JULIANI H.R. (2012). Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties *Molecules*, 17, 3989-4006.
69. NGUEFACKA J., TAMGUEA O., LEKAGNE DONGMOA J.B., DAKOLEA C.D., LETH V, VISMERC H.F., AMVAM ZOLLOA P.H., NKENGFACKD A.E. (2012). Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum* *Food Control*, 23, 377-383.
70. NURBAS M., BAL Y. (2005). Recovery of fixed and volatile oils from *Laurus nobilis* L. fruit and leaves by solvent extraction method- *Eng & Arch. Fac XVIII*, 2.

71. OUSSOU K R., YOLOU S., BOTI J B., GUESSENND K N., KANKO C., AHIBO, C., CASANOVA, J. (2008). Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 24(1), 94-103.

P

72. PAWAR VC., THAKER VS. (2006). *In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, 49, 316–323.
73. PIBIRI M C. (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorale. Ecole poly technique fédérale, EPFL. Lausanne (Suisse).
74. PONCEA A G., FRITZ R., DEL VALLEB C., ROURA S I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*, 36, 679–684
75. PREEDY V R. (2016). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* Academic Press Elsevier London, UK

R

76. RAHAL S. (2004). *Chimie des Produits Naturels et des Etres Vivants*. O.P.U. Edition. Alger.
77. RAO A., ZHANG Y., MUEND S., RAO R. (2010). Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 54, (12), 5062–5069
78. RAYMOND M. (2005). *L'aromathérapie chez le nourrisson et le petit enfant*. Thèse Doctorat. Nantes, France.
79. REYES-JURADO F., LOPEZ-MALO A., PALOU E. (2016). Antimicrobial Activity of Individual and Combined Essential Oils against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Journal of Food Protection*, 79, (2) 309–315.
80. RIOS J L. (2016). Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. In : PREEDY V R. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press . Elsevier. USA.
81. RIOS J.L., RECIOM.C., VILLAW A., (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature *Journul of Ethnopharmacology*, 23, 127-149.

82. ROZMAN V., KALINOVIC I., KORUNIC Z. (2007). Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 43, 349–355.

S

83. SACCHETTI G., MAIETTI S., MUZZOLI M., SCAGLIANT M., MANFREDINI S., RADICE M., Bruni R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chemistry* 91, 621-632.

84. SALZER UJ. (1977). The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings. a critical review. *C.R.C Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 9, 345-373.

85. SANTOS F.A, RAO V.S.N. 2000. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother. Res.*, 14, 240-244.

86. SENATORE F. (1996). Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J. Agric. Food Chem.* 44, 1327-1332.

87. SHARIFI-RAD J., SUREDA A., TENORE G C., DAGLIA M., SHARIFI-RAD M., VALUSSI M., TUNDIS R., SHARIFI-RAD M., R. LOIZZO M., ADEMILUYI A O 10,11, SHARIFI-RAD R 1, AYATOLLAHI S A IIRITI M. (2017). Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems Review. *Molecules*, 22, 1-55.

88. SHIN S., KIM J H., (2005). *In Vitro* Inhibitory Activities of Essential Oils from Two Korean *Thymus species* against Antibiotic Resistant Pathogens. *Arch Pharm Res Vol 28, No 8, 897-901*.

89. SMITH-PALMER A., STEWART J., FYFE. L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26,118-122.

90. SVOBODA K P., HAMPSON J B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities.

T

91. TEUSCHER E., ANTON R., LOBSTEIN A. (2005). *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Tec et Doc éditions, Paris.

92. THRIPATHI A., UPADHYAY S., BHUIYAN M., BHATTACHARYA P R., (2009). A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of pharmacognosy and Phytotherapy*, 15, (5), 52-63.
93. TIWARI B., VALDRAMIDIS V., DONNELL C., MUTHUKUMARAPPAN K., BOURKE P., CULLEN P. (2009). Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation *J. Agric. Food Chem*, 13-78.
94. TULEY DE SILVA. K. 1995. *A Manual On The Essential Oil Industry* UNIDO, Vienna, Austria.
95. TUREK C., STINTZING F C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*, 12, 40-53.

U

96. ULTREE A., SLUMP R A., STEGING G., SMID E J. (2002). Antimicrobial activity of carvacrol on rice. *Journal of food protection*, 63, 620-624.

V

97. VANDER-BERGHE DA, VLIETINCK N. (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Dey PM, Harborne JB (eds). *Methods in plant biochemistry*: Academic Press London. UK.
98. VELLUTI A., SANCHIS V., RAMOS AJ., TURON C., MARIN S. (2004). Impact of essential oil on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity condition in maize grain. *J Appl Microbiol*, 96, 716 -724.

W

99. 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(2), 152–158.
100. WILSON. M (2010). *Huiles essentielles : pour la cuisson et le bien-être*. Fides, Québec.

Y

101. YALCIN H., ANIK M., SANDA M., CAKIR A. (2007). Gas chromatography/mass spectrometry analysis of laurus nobilis essential oil composition of northern Cyprus - *J Med Food*.10, (4), 715-719.
102. YANIV Z., DUDAI. N. (2012), *Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East, Medicinal and Aromatic Plants of the World*. Springer. Hungary.

Z

103. ZAIKA L. (1987). spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination1. *Food & Nutrition Press, Journal of Food Safety*, 9, 97-118.
104. ZHOU F., JI B., ZHANG H ., JIANG H., YANG Z, LI J., LI J., REN Y., YAN W. (2007). Synergistic Effect of Thymol and Carvacrol Combined with Chelators and Organic Acids against *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Food Protection*,70, (7), 1704–1709.

Annexe

Annexe I : composition chimique par chromatographie phase gazeuse de huile essentielle de laurier noble (ANONYME-2, 2017).

Famille de composés	composés	Teneurs en % :
Oxydes	1,8-cinéole (eucalyptol)	41.76
Esters	Acétate de terpényle	9.47
	Acétate de δ -terpényle	0.50
	Acétate de bornyle	0.38
	Acétate de linalyle	0.17
Monoterpènes	Sabinène	7.22
	α -pinène	6.65
	β -pinène	4.64
	Limonène	1.68
	γ -terpinène	1.15
	β -myrcène	1.05
	p-cymène	0.82
	α -terpinène	0.66
	Camphène	0.61
	α -phellandrène	0.32
	Terpinolène	0.30
	Monoterpénols	Linalol
Terpinène-4-ol		2.65
α -terpinéol		2.22
δ -terpinéol		0.34
trans-thuyanol		0.25
cis-thuyanol		0.23
	Nérol	0.18
Phénol-méthyl-éthers	Méthyleugénol	2.28
Phénols	Eugénol	1.07
Sesquiterpènes	β -élémane	0.61
	β -caryophyllène;	0.50
	δ -cadinène;	0.28
	γ -cadinène;	0.13
	α -humulène	0.12
Cétones	2-undécanone	0.17

Annexe II : certificat d'analyse d'huile essentielle de thym effectuer par chromatographie phase gazeuse (ANONYME-1. 2017).

CERTIFICAT D'ANALYSES / CERTIFICATE OF ANALYSIS

Thym linalol / Thyme linalool

Huile Essentielle Docteur Valnet Certifiée Agriculture Biologique*
Docteur Valnet Essential Oil Organic Certified*

Nom botanique / Botanical name	Thymus vulgaris linaloliferum				
Famille botanique / Botanical family	Lamiacées	N° de lot (vrac) / Batch Nb (bulk)	211CB92350158		
Parties utilisées / Parts used	parties aériennes	N° de lot (conditionnement) / Batch nb (packaging)	17A017		
Mode d'extraction / Extraction process	entraînement à la vapeur d'eau basse pression / low-pressure steam distillation				
Pays de production / Country of production	Espagne / Spain				
Paramètres	Spécifications	Résultats	Conclusion		
Aspect / Appearance	liquide mobile, limpide / limpid, mobile liquid	liquide mobile, limpide / limpid, mobile liquid	conforme / conform		
Couleur / Colour	incolore à jaune / colorless to yellow	jaune pâle / pale yellow	conforme / conform		
Odeur / Odour	caractéristique / characteristic	caractéristique / characteristic	conforme / conform		
Densité / Specific gravity	0,870 à / to 0,885	0,8741	conforme / conform		
Pouvoir rotatoire / Optical rotation	-20° à / to +1°	-3,4°	conforme / conform		
Indice de réfraction / Refractive index	1,460 à / to 1,475	1,4686	conforme / conform		
Identification par CPG / Identification by GC					
TR	Composants	%	TR	Composants	%
4,94	MW 136	0,271	9,04	isobutyrate d'hexyle	0,291
4,98	tricyclène	0,041	9,11	camphre	0,438
5,07	alpha-thujène	0,184	9,51	bornéol	1,648
5,22	alpha-pinène	2,877	9,64	terpinène-4-ol	11,486
5,55	camphène	0,865	9,86	alpha-terpinéol	1,421
6,02	sabinène	0,779	9,90	cis-dihydrocarvone	0,277
6,10	béta-pinène	0,348	10,00	trans-dihydrocarvone	0,237
6,20	octène-3-ol	0,064	10,06	verbénone	0,127
6,29	3-octanone	0,059	10,20	formate de bornyle	0,077
6,36	myrcène	7,326	10,27	nérol	0,076
6,66	alpha-phellandène	0,428	10,35	carvacrol méthyl-éther	0,146
6,86	alpha-terpinène	3,340	10,63	géraniol	0,602
7,01	para-cymène	1,501	11,14	acétate de bornyle	0,075
7,09	limonène	2,445	11,22	thymol	0,115
7,11	béta-phellandène	0,762	11,33	carvacrol	0,065
7,15	eucalyptol	0,667	11,98	acétate d'alpha-terpényle	0,019
7,24	(Z)-béta-ocimène	0,063	12,38	acétate de géraniyle	0,036
7,41	(E)-béta-ocimène	0,124	12,49	béta-bourbonène	0,044
7,62	gamma-terpinène	7,619	12,95	béta-caryophyllène	1,131
7,84	cis-oxyde de linalol	1,299	13,41	alpha-humulène	0,052
8,07	terpinolène	1,300	13,46	allo-aromadendène	0,026
8,12	trans-oxyde de linalol	0,445	13,72	germacrène D	0,079
8,38	linalol	45,978	13,90	bicyclogermacrène	0,186
8,41	hotriénol	1,077	14,10	gamma-cadinène	0,017
8,57	acétate d'octène-3-yle	0,051	14,15	déelta-cadinène	0,044
8,75	cis-para-ment-2-ène-1-ol	0,347	14,86	germacrène-D-4-ol	0,030
			14,93	oxyde de caryophyllène	0,069
				TOTAL	99,07

*Certifié Agriculture Biologique conformément au Rglf CEE N° 834/2007 par FR-BIO 10 (BUREAU VERITAS Certification)

*Organic certified in accordance with EEC Regulation N° 834/2007 by FR-BIO 10 (BUREAU VERITAS Certification)

Lot accepté le / Batch accepted on the :
11 janvier 2017

Approuvé par / Approved by
Michel Morineau



Annexe III : Observation à l'état frais :

III. Observation à l'état frais :

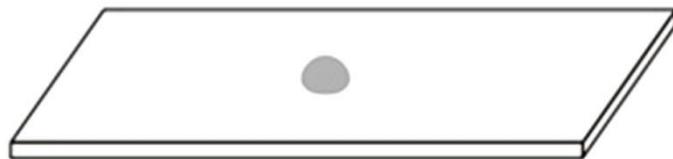
III.1. BUT : Observer les bactéries vivantes. Ceci permet de:

- Mettre en évidence leur mobilité.
- Mettre en évidence leur mode de groupement.
- Faire une approche de leur morphologie.

I.2. Technique

L'examen à l'état frais se pratique sur les cultures en milieu liquide (en milieu solide, la mobilité s'exprime mal et de façon aléatoire).

- Homogénéiser la culture liquide à prélever.
- Prélèvement: prélever une goutte de culture liquide (à la pipette Pasteur ou à l'anse de platine) et la déposer sur une lame propre. Attention! Une goutte trop grosse risque de déborder à l'étape suivante.
- Pose de la lamelle, en partant d'une position inclinée à 45°. Attention! Le liquide ne doit pas déborder.



- L'observation se fait à l'objectif x40,

Annexe IV: Coloration au bleu de méthylène

IV.1. Technique

- Réaliser un frottis et le fixer
- Le recouvrir de bleu de méthylène n et laisser agir 3 minutes
- Rincer à l'eau distillée
- Sécher entre 2 feuilles de papier essuie-tout.

IV.2.Observation

Examiner à l'objectif x100 à immersion (avec une goutte d'huile) avec un éclairage important (diaphragme ouvert).

Toutes les cellules apparaissent colorées en bleu, cette coloration permet d'observer la morphologie des bactéries, leur mode de groupement et la présence de cellules.

Annexe V : Coloration de Gram (coloration différentielle)

Elle a été mise au point en 1884 par le bactériologiste danois **HANS CHRISTIAN GRAM**.

V.1. Réalisation du frottis

Sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile (ou directement le prélèvement s'il est liquide). Ajouter à la goutte une colonie isolée, étaler et fixer à la chaleur d'une platine à environ 40°C. Une fois sèche, recouvrir la lame d'alcool pendant une minute. Retirer l'alcool et mettre à sécher sur la platine. Poser la lame séchée sur le portoir reposant sur un bac de coloration.

V.2. Réalisation de la coloration de Gram

- Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincez à l'eau.

- Mordançage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étalez le lugol et laissez agir le même temps que le violet de gentiane ; rincez à l'eau déminéralisée.

- Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone) est l'étape la plus importante de la coloration : verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration.

Rincer abondamment avec de l'eau déminéralisée pour stopper la décoloration. Attention, l'utilisation abusive de l'alcool aura pour conséquence de rendre toutes les bactéries gram négatif.

- Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Mettre de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 50°C.

Observer avec une goutte d'huile à immersion à l'objectif 100 (grossissement $\times 1000$).