

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

M. YANN-OLIVIER MARIE HAY

le vendredi 13 novembre 2015

Titre :

LA COMPLEXITE DES SIMPLES - CARACTERISATIONS CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE COMBINAISONS HYDROLATS-HUILES ESSENTIELLES ET HUILES ESSENTIELLES-HUILES ESSENTIELLES POUR L'OBJECTIVATION D'EFFETS CONSERVATEURS DE PRODUITS PHYTOTHERAPEUTIQUES

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (L.C.A.)

Directeur(s) de Thèse :

MME CHRISTINE RAYNAUD

Rapporteurs :

Mme LUICITA LAGUNEZ RIVERA, INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL MEXICO

Mme SUSANA FIORENTINO, PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA BOGOTA

Membre(s) du jury :

M. CARLOS VACA GARCIA, INP TOULOUSE, Président

M. LUIS FERNANDO ECHEVERRI, UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, Membre

Mme FRANCOISE NEPVEU, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

M. MICHEL KAEMMERER, INP TOULOUSE, Membre

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu COLCIENCIAS pour la bourse de thèse octroyée dans le cadre du projet "DESARROLLO DE ALTERNATIVAS DE CONSERVACIÓN EN PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS 100%NATURALES", code 477-2011, projet exécuté par l'alliance PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA - FARMAVERDE. Je remercie aussi la faculté de chimie de l'université Javeriana pour m'avoir permis de réaliser mon travail de thèse au sein du laboratoire de phytochimie.

Un grand merci à Christine Raynaud pour avoir accepté de diriger cette thèse dans des conditions peu confortables étant donné la distance, mais aussi pour sa disponibilité et son aide tout au long de ces quatre années.

Je tiens à remercier spécialement Alejandro Reyes, chargé de la salle de chromatographie à l'université Javeriana pour le temps dédié à m'expliquer et m'aider à résoudre différents sujets en relation avec la chromatographie.

Je remercie aussi Gonzalo Sequeda et Juliet Prieto pour leurs conseils scientifiques concernant les activités biologiques et les analyses de composition chimique.

Grand merci Gypsy pour la révision de mon franglais dans les publications !

Je remercie tout spécialement Catherine Bonnafous pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, du jury et tout simplement pour avoir été très présente à distance durant ces derniers mois. Merci Catherine, non seulement pour tes encouragements mais aussi pour le partage généreux de tes connaissances, ta patience et ta disponibilité à transformer cinq minutes en une demi-heure d'entretien !

Je tiens à remercier aussi tout spécialement Miguel Abril sans qui cette thèse n'aurait jamais existé. Merci Miguel pour les enseignements partagés mais aussi et surtout pour votre persistance et volonté ambitieuse de découvrir, d'apprendre et de ne jamais cesser d'améliorer ou de formuler et développer des produits 100% naturels avec une dextérité impressionnante.

Sœurette, merci pour ta disponibilité, tes encouragements avant et pendant cette thèse, tes précieux conseils constructifs ou déstabilisants, tu auras été sans aucun doute l'une des personnes les plus présentes durant ces dernières années!

Papa, maman, merci pour vos chaleureuses pensées, encouragements et bien plus encore ; structure, sensibilité, ordre, volonté, valeurs, principes que vous m'avez transmis, pérennisent votre présence malgré la distance.

Amalia, merci pour ta compréhension, ta patience, ton appui et tes encouragements tout au long de cette thèse et tout particulièrement durant ces derniers mois plus difficiles. Esteban, Charlotte, je vous remercie aussi tous les deux pour vos sourires, vos paroles, petits mots et encouragements.

Thèse, je te remercie pour cette invitation de plusieurs années à cogiter et de nouveau me rappeler que malgré son immensité, la méthode scientifique reste vaine pour comprendre et profiter de manière absolue de la complexité des simples pour un véritable développement durable. La méthode d'Edgar Morin nous y invite pourtant depuis plusieurs années.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction générale 3

CHAPITRE 1 – ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE 7
Introduction 8

1. Les Huiles essentielles 8
1.1. Définition 8
1.2. La distillation par entraînement à la vapeur 10
1.3. Chémotype, identité moléculaire et facteurs de variation 11
1.4. Interaction entre l'HE et les solvants d'analyse 17
1.5. Activité conservatrice 18
1.6. Interactions : synergie, additivité, antagonisme et indifférence 21
1.7. La règlementation européenne de l'usage des Huiles Essentielles 27

2. Les hydrolats 32
2.1. Définition 32
2.2. Activités biologiques 34

3. Huiles essentielles et hydrolats étudiés 35
3.1. Critères de sélection 35
3.2. *Calendula officinalis* 38
3.2.1. Phytochimie 39
3.2.2. Activité antimicrobienne 40
3.2.3. Activité antioxydante 40
3.2.4. Propriétés 40
3.3. *Rosmarinus officinalis* 41
3.3.1. Phytochimie 42
3.3.2. Activité antimicrobienne 42
3.3.3. Activité antioxydante 45
3.3.4. Propriétés 46
3.3.5. Objectivations 48
3.3.6. Contre-indications et précautions 49
3.3.7. Posologie 51
3.3.8. Toxicité 51
3.4. *Thymus vulgaris* 52
3.4.1. Phytochimie 53
3.4.2. Activité antimicrobienne 53
3.4.3. Activité antioxydante 58
3.4.4. Propriétés 59
3.4.5. Objectivations 59
3.4.6. Contre-indications et précautions 61
3.4.7. Toxicité 61
3.5. *Lippia alba* 61

3.5.1. Phytochimie 62
3.5.2. Activité antimicrobienne 63
3.5.3. Activité antioxydante 64
3.5.4. Propriétés 64
3.5.5. Indications thérapeutiques 65
3.5.6. Contre-indications 65
3.5.7. Précautions et effets secondaires 65
3.5.8. Toxicité 65

4. Méthodes d'analyse chimique des huiles essentielles et hydrolats 66

5. Méthodes d'analyse de l'activité antioxydante 68
5.1. Caractérisation du mécanisme antioxydant 68
5.2. Activité antiradicalaire sur le DPPH 71
5.3. Activité antiradicalaire sur l'ABTS 75
5.4. Méthode d'analyse de l'activité antimicrobienne 77
Conclusion 79

CHAPITRE 2 – DISTILLATIONS, CODISTILLATIONS ET CARACTERISATIONS CHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES ET HYDROLATS 81

Introduction 82
1. Matériel et méthodes 82
1.1. Production et transformation post récolte de la matière végétale 82
1.2. Description des méthodes de distillation 84
1.3. Analyse chimique des huiles essentielles et hydrolats 90

2. Résultats et discussion 91
2.1. Thymus vulgaris 91
2.2. Rosmarinus officinalis 99
2.3. Lippia alba 101
2.4. Distillations simultanées 103
Conclusion 110

CHAPITRE 3 – CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES, HYDROLATS ET DE LEURS COMBINAISONS 113

Introduction 114
1. Matériel et méthodes 114
1.1. Étude des interactions 114
1.2. Activité antiradicalaire sur le DPPH 116
1.3. Activité antiradicalaire sur l'ABTS 119
1.4. Activité antimicrobienne 122
1.4.1. Microorganismes 122
- *Escherichia coli* 123
- *Pseudomonas aeruginosa* 124
- *Staphylococcus aureus* 124

- *Aspergillus niger* 124
- *Candida albicans* 125
1.4.2. Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne 125
1.4.2.1. Préparation des bactéries 125
1.4.2.2. Préparation des levures 126
1.4.2.3. Préparation des huiles essentielles et hydrolats 126
1.4.2.4. Description des méthodes appliquées 126

2. Résultats et discussion 130
2.1. Activité antioxydante sur le DPPH 130
2.2. Activité anti radicalaire sur l'ABTS des huiles essentielles et hydrolats obtenus selon deux méthodes de distillation 132
2.3. Activité anti radicalaire sur l'ABTS des huiles essentielles et hydrolats non combinés et combinés 134
2.4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles et hydrolats obtenus selon deux méthodes de distillation 138
2.5. Activité antimicrobienne des huiles essentielles et hydrolats non combinés et combinés 139
Conclusion 145

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 148
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 156

Annexe 1. IC50 des huiles essentielles de *T. Vulgaris* sur le DPPH 173
Annexe 2. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB en µl/L.) des HE et HD contre *Escherichia coli*. 174
Annexe 3. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB en µl/L.) des combinaisons contre *Escherichia coli*. 175
Annexe 4. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB en µl/L.) des HE et HD contre *Pseudomonas aeruginosa*. 176
Annexe 5. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB en µl/L.) des combinaisons contre *Pseudomonas aeruginosa*. 177
Annexe 6. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB en µl/L.) des HE et HD contre *Staphylococcus aureus*. 178
Annexe 7. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB en µl/L.) des combinaisons contre *Staphylococcus aureus*. 179
Annexe 8. Concentrations Minimales Fongicides (CMF en µl/L.) des HE et HD contre *Candida albicans.* 180
Annexe 9. Concentrations Minimales Fongicides (CMF en µl/L.) des combinaisons contre *Candida albicans.* 181
Annexe 10. Concentrations Minimales Fongicides (CMF en µl/L.) des HE et HD contre *Aspergillus niger*. 182
Annexe 11. Concentrations Minimales Fongicides (CMF en µl/L.) des combinaisons contre *Aspergillus niger.* 183
Annexe 12. Liste des activités biologiques des 2 molécules principales de chaque huile essentielle étudiée. 184
Publications et participation à des congrès 185

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Pourcentages relatifs de molécules majoritaires d'huiles essentielles de *Thymus* vulgaris. 13
Tableau 2. Indices de Concentration Fractionnaire Inhibitrice utilisés pour déterminer le type d'interaction (Bassolé et Juliani 2012). 27
Tableau 3. MIC_{80} de différents HE issues de plusieurs Chémotypes de T. vulgaris et d'amphotéricine B Giordani *et al.* (2004)..... 54
Tableau 4. MIC des HE et molécules principales de différentes bactéries selon Kaloustian *et al.* (2008)..... 55
Tableau 5. Activité antimicrobienne des HE de T. vulgaris et R. officinalis L. contre les bactéries pathogènes humaines en utilisant la méthode de diffusion et détermination des valeurs de CIM et MBC (mg/ml) (Miladi *et al.* , 2013) 57
Tableau 6. Rendements d'extraction en Hydrolats..... 88
Tableau 7. Volumes, masses et rendements utilisés et obtenus avec les deux méthodes de distillation 89
Tableau 8. Composition des huiles essentielles de *Rosmarinus* officinalis et *Thymus* vulgaris obtenues par deux méthodes de distillation par entrainement à la vapeur. 97
Tableau 9. Composition des hydrolats de *Rosmarinus* officinalis et *Thymus* vulgaris obtenues par deux méthodes de distillation par entrainement à la vapeur..... 98
Tableau 10. Composition de l'hydrolat et de l'huile essentielle de *Lippia* alba obtenues par la méthode conventionnelle de distillation par entrainement à la vapeur..... 102
Tableau 11. Volumes et masses utilisés et rendements obtenus avec les 3 codistillations 104
Tableau 12. Compositions des huiles essentielles obtenues par les codistillations 3PD1, 3PD2 comparées à celles des huiles essentielles de Romarin (RoFHE) et Thym (TvFHE)(%).105
Tableau 13. Compositions des hydrolats obtenus par les co-distillations 3PD1, 3PD2 et TvRo comparées à celles des hydrolats de Romarin (RoFHD1) et Thym (TvFHD1)(%)..... 109
Tableau 14. Moyenne des CI_{50} des huiles essentielles de T. *vulgaris* évaluées par la méthode DPPH..... 132
Tableau 15. Moyenne des CI_{50} avec l'ABTS des huiles essentielles et hydrolats de T. *vulgaris* et R. officinalis obtenus avec deux méthodes de distillation..... 133
Tableau 16. Efficacité des huiles essentielles et hydrolats pour piéger le radical libre ABTS (CI_{50}) 135
Tableau 17. Indices de Concentrations Fractionnaires Antioxydantes des combinaisons d'huiles essentielles et d'hydrolat 137
Tableau 18. CMB et CMF des HE et HD obtenues avec les deux méthodes de distillation. 139
Tableau 19. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) (µL/mL) des huiles essentielles et hydrolats non combinés et combinés sur les bactéries sélectionnées. 141
Tableau 20. Concentrations Minimales Fongicides (CMF) (µL/mL) des huiles essentielles et hydrolats non combinés et combinés sur les levures sélectionnées. 142
Tableau 21. Index des Concentrations Fractionnaires Minimales Inhibitrices (CFMI) des combinaisons d'huiles essentielles et d'hydrolats sur les bactéries et levures sélectionnées. 145

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Schéma de la distillation à la vapeur d'eau 11
Figure 2. Résumé de différentes voies de Biosynthèse végétale (Michalet, 2015) 12
Figure 3. Signaux environnementaux de nature physique, chimique ou biologique, pouvant affecter la croissance et le développement des plantes (Buchanan *et al.* , 2000 in Hoffmann, 2003). 15
Figure 4. Rendement et composition de l'huile essentielle de *Thymus* vulgaris en fonction du stade de récolte (Lamy *et al.*, 1979)..... 16
Figure 5. Un isobologramme schématique (Zeman, 2008) 25
Figure 6. Planche botanique de Calendula officinalis (Köhler's Medicinal Plants, 1887)..... 38
Figure 7. Planche botanique de *Rosmarinus* officinalis (Köhler's Medicinal Plants, 1887) 41
Figure 8. Planche botanique de *Thymus* vulgaris (Köhler's Medicinal Plants, 1887)..... 52
Figure 9. Planche botanique de Lantana mollissima (synonime de *Lippia* alba) Herbier général de l'amateur, vol. 8 (1817-1827) [P. Bessa]..... 61
Figure 10. Distribution des chémotypes de lippia alba en Amérique..... 63
Figure 11 . Le radical libre DPPH (Z•) et son homologue réduit (ZH). 72
Figure 12. Les trois hypothèses de Brand-Williams concernant l'activité anti-radicalaire des composés phénoliques..... 74
Figure 13. Méthode de distillation conventionnelle et méthode "Farmaverde" 85
Figure 14. Profils chromatographiques CPG-SM des lots TvDCHE1 et TvDFHE1 (à gauche en haut et en bas respectivement) et des lots TvDCHE3 et TvDFHE3 (à droite en haut et en bas respectivement). Pics caractéristiques et temps de rétention respectivement: gamma terpinène : 11.09 ; p-cymène : 11.7; linalol : 17.2 ; Caryophyllène : 18.7 ; thymol : 28.9. . 93
Figure 15. Profils chromatographiques des lots TvDCHD1 et TvDFHD1 obtenus en CPG-SM avec la colonne INNOWAX avec les pics caractéristique du p-cymène au temps 11.5 min, le thymol à 28.8 min et carvacrol à 29.4 min. 96
Figure 16. Profils chromatographiques CPG-SM des lots RoDCAE1 et RoDFAE1 (à gauche en haut et en bas respectivement) et des lots RoDCAE3 et RoDFAE3 (à droite en haut et en bas respectivement). Pics caractéristiques et temps de rétention respectivement: alpha-pinène : 6.9 ; camphène : 7.6; béta-pinène : 8.3 ; limonène : 10.1 ; 1.8 cinéol : 10.3; camphre : 17.2 ; verbénone : 20.9 ; bornéol : 21.5. 100
Figure 17. Profils chromatographiques des HE 3PD1, 3PD2 (en haut) et Ro et Tv (en bas) 107
Figure 18. Profils chromatographiques des hydrolats de Romarin de Thym et des deux plantes co-distillées, obtenus par l'analyse HS-SPME-CPG-SM en utilisant une colonne INNOWAX. . 108
Figure 19. Pourcentage d'inhibition de l'HE de Thym TvDCHE2 sur DPPH en fonction du temps à différentes concentrations (µL/L)..... 118
Figure 20. Cinétique réactionnelle de l'HE de Thym vulgaris TvDFHE3 sur le radical DPPH en fonction du temps 118
Figure 21. Cinétique de la réaction antiradicalaire des HE de Pronto Alivio, Romarin et Thym et de l'hydrolat de Thym sur l'ABTS. 121

TABLE DES PHOTOS

Photo 1. Cultures associçées de Rue (Ruta graveolens), Souci (Calendula officinalis), Achillée millefeuille (Achillea millefolium) et Bourrache (Borrago officinalis) à la ferme de FARMAVERDE (Usme, Bogota, COLOMBIE) 83
Photo 2. Cultures associées de Thym (*Thymus* vulgaris), Camomille (Matricaria recutita) et Achillée millefeuille (Achillea millefolium) à la ferme de FARMAVERDE (Usme, Bogota, COLOMBIE) 83
Photo 3. Séchage naturel du matériel végétal. 84
Photo 4. Distillateur utilisé pour l'extraction des huiles essentielles et hydrolats, Miguel Abril et Yann-Olivier Hay. 86
Photo 5. le BIOSCREEN C utilisé à l'université Javeriana (Bogota, COLOMBIE) 123
Photo 6. Résultats de l'essai 50 (27/08/2014) après application du sel de Tetrazolium et incubation de 30 min. 128
Photo 7. Résultats d'un essai de l'HE de *Lippia* alba contre Aspergillus niger. 130

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABTS	acide 2,2′-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique
BMH	Bouillon Muller Hinton
DC	Distillation Conventionnelle
DF	Distillation Farmaverde
DMSO	Diméthylsulfoxide
DPPH	2,2′-diphényl-1-picryhydrazyle
HD	Hydrolat
HE	Huile Essentielle
La	*Lippia alba*
Ro	*Rosmarinus officinalis*
Tv	*Thymus vulgaris*

Introduction générale

Élaborer des produits 100% naturels sains et efficaces qui répondent à la demande du consommateur averti. Tel est le défi de l'industriel éthique et soucieux de respecter l'exigence du consommateur et l'environnement avec un produit « éco-conçu » tout en respectant les obstacles imposés tout particulièrement par la variabilité naturelle de l'extrait végétal utilisé comme ingrédient duquel dépendra non seulement l'efficacité et la sécurité du produit fini mais aussi sa stabilité tout au long de sa durée de vie utile.

Comme l'ont reportés Kumar *et al.*(2008), bien que différents ingrédients chimiques d'origine synthétique, tels que des fongicides ou des conservateurs de produits finis, ont permis de réduire des pertes, l'usage de ces substances a des conséquences négatives en termes de toxicité résiduelle, de déséquilibre hormonaux, d'effets carcinogènes et de spermatotoxicité qui affectent l'environnement et la santé humaine. Outre ces effets, l'usage excessif des molécules synthétiques antimicrobiennes implique le développement de mécanismes de résistance à plusieurs molécules les rendant ainsi inutiles de même que les antibiotiques utilisés en santé humaine. Gholoum (2013) a reporté que des antioxydants tels que l'hydroxyanisole butylé (BHA) et hydroxytoluène butylé (BHT), lesquels sont ajoutés aux aliments pour améliorer leur durée de vie utile, convertissent certains composés ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant l'activité d'enzymes microsomales.

Les huiles essentielles (HE) font partie des extraits végétaux utilisés comme alternative pour remplacer les conservateurs synthétiques. Les HE sont des composés volatils aromatiques extraits du matériel végétal au moyen de différentes méthodes. La plus traditionnelle et ancienne de ces méthodes est la distillation par entrainement à la vapeur. La vapeur d'eau et la pression rompent les structures des cellules de la plante et libèrent les volatils du substrat cellulosique. La vapeur chargée en molécules aromatiques se condense ensuite lorsqu'elle passe à travers un condensateur pour donner une HE et un hydrolat (HD) (hydrosol en anglais).À la différence des HE, les HD ont été peu étudiés malgré l'intérêt des industries alimentaires, cosmétiques et phytothérapeutiques de trouver des alternatives de conservateurs naturels. De

même, peu d'information reportent l'évaluation de l'activité antioxydante des HD: Aazza *et al.*(2011) and Djabou *et al.*(2014).

Cependant, ce co-produit de la distillation peut offrir différents bénéfices ; son usage en tant qu'ingrédient peut être source de principes actifs thérapeutiques mais aussi de conservateurs tout spécialement en hydrolathérapie laquelle est étroitement liée à la phytothérapie et l'aromathérapie.

L'usage des HE et HD en tant que conservateurs ou substances thérapeutiques implique cependant un contrôle assidu de différents facteurs de variation. Les saisons (Jordan *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2008), le climat (Sangwan *et al.*, 2001), le photopériodisme (Sangwan *et al.*, 2001), la situation géographique (Abu-Darwish and Abu-Dieyeh 2009; Popovici *et al.*, 2008; Zaouali *et al.*, 2005), les stades phrénologiques (Nejad Ebrahimi *et al.*, 2008) et d'autres facteurs écosystémiques influent sur la composition de l'HE. C'est aussi le cas des méthodes de distillation dont l'impact sur la composition chimique a aussi été étudié (Peng *et al.*, 2004; Sefidkon *et al.*, 2007). Ces changements de composition chimique ont évidemment des conséquences sur l'activité biologique des extraits. La comparaison des méthodes d'extraction impliqueront des prises de décision technologiques importantes dans l'industrie en termes de sécurité, efficacité et de couts.

De nombreuses études (Miladi *et al.*, 2013; Nowak et al, 2012; Nedorostova *et al.* 2009; Gutierrez *et al.*, , 2008; Paparella *et al.*, 2008; Oussalah *et al.*, 2007; Burt, 2004) ont reporté l'efficacité antimicrobienne des HE et ont souligné l'importance de limiter leur parfum et arôme pour améliorer les caractéristiques organoleptiques des produits alimentaires et des produits cosmétiques. L'usage de combinaisons pourrait minimiser ces effets collatéraux sensoriels (Gutierrez *et al.* 2009) et contrôler certaines bactéries connues pour développer certaines résistances aux antimicrobiens naturels tels que *Pseudomonas spp*. Bien que les HD n'aient pas été étudiés autant que les HE et que leur usage ne soit pas aussi courant dans l'industrie, ils peuvent offrir différents bénéfices pour l'agriculture en tant qu'intrants ou en santé humaine tel que le propose Bosson (2011) qui présente différentes indications thérapeutiques pour une liste importante d'hydrolats. L'auteur propose par exemple l'usage de l'HD de Thym à thymol pour détoxifier et purifier

l'organisme, mais ne mentionne que l'usage d'un HD de Romarin à verbénone. Par ailleurs, aucun travail de recherche n'a été réalisé jusqu'à présent concernant l'usage de combinaisons d'HE et d'HD.

Les travaux de cette thèse ont deux objectifs principaux.

Le premier objectif est d'étudier comparativement la composition chimique ainsi que les activités biologiques des HE et HD obtenus avec la méthode conventionnelle de distillation par entrainement à la vapeur et une autre méthode de distillation développée pour optimiser l'élaboration de produits phytothérapeutiques, laquelle utilise un macérât aqueux de la plante comme source de vapeur. Deux HE communes européennes *Thymus vulgaris* (Thym) et *Rosmarinus officinalis* (Romarin) cultivées dans le sud de Bogotá en Colombie ont été sélectionnées pour ces travaux en raison de leurs activités antimicrobienne et antioxydante lesquelles ont été reportées par de nombreux chercheurs comme Miladi *et al.*, 2013; Hajlaoui *et al.*, 2010; Zaouali *et al.*, 2010; Imelouane *et al.*, 2009; Snoussi *et al.*. 2008; Kumar *et al.*, 2008; Pasqua et Feo, 2005. Les résultats de ces travaux sont présentés dans les chapitres 2 et 3.

Une étude sur l'impact des procédés de co-distillations de deux et trois plantes sur la composition chimique des HE et HD est aussi présentée dans le chapitre 2 en intégrant la plante *Lippia alba*, espèce originaire d'Amérique latine, cultivée à Guaduas, dans le département de Cundinamarca en Colombie

Dans le cadre du second objectif, les combinaisons HE-HE et HE-HD des HE et HD ayant démontré des activités antioxydantes et antimicrobiennes positives ont été évaluées et discutées afin de les valoriser en tant que conservateurs dans les produits phytothérapeutiques. L'interaction des combinaisons évaluées a été caractérisée en appliquant la méthode du checkerboard avec les indices de Concentrations Fractionnaires Inhibitrices. Cette méthode habituellement utilisée pour évaluer les interactions d'extraits sur l'activité antimicrobienne a aussi été adaptée dans le cadre du présent travail de recherche à l'activité antioxydante. Outre les activités antioxydante et antimicrobienne, d'autres activités biologiques ayant un effet médicinal ont aussi été explorées dans le chapitre 3. Les notions de qualité, efficacité et sécurité sont discutées dans la conclusion générale du manuscrit.

CHAPITRE 1 – ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

L'étude bibliographique exposée dans ce premier chapitre définit les huiles essentielles et hydrolats et présente l'état de l'art correspondant à l'étude de leurs caractéristiques intrinsèques, leurs variations moléculaires, leurs activités antimicrobienne et antioxydante, l'études d'interaction avec d'autres huiles et la réglementation officielle européenne concernant les huiles essentielles, réglementation dont l'évolution est de plus en plus complexe compte tenu des accords entre les différents pays où elle s'applique. Suite à la présentation des critères de sélection des huiles essentielles et hydrolats étudiés, une révision bibliographique de chacun d'entre eux est exposée. Finalement, les méthodes analytiques utilisées au cours de ces travaux sont présentées et discutées.

1. Les Huiles essentielles

1.1. Définition

La norme AFNOR NF T 75-006 définit 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 ».

Le terme « huile essentielle » est strictement réservé au produit aromatique issu de la distillation, compte tenu du fait, comme nous le verrons ci-après que les autres techniques d'extraction ne permettent pas d'obtenir l'huile essentielle en tant que telle. Avant son extraction, lorsqu'elle se trouve dans la plante, l'huile essentielle est appelée essence. Les essences sont des mélanges complexes de métabolites secondaires – caractérisés ainsi car ils ne participent pas directement à la croissance de la plante - impliqués dans des mécanismes de défense ou d'attraction de la plante ; défense contre les herbivores ou les phytopathogènes (champignons, virus et bactéries) ou l'attraction de pollinisateurs, elles constituent des stimulus pour les microorganismes bénéfiques et participent aussi à la protection de la plante contre les rayons UV (Theis & Lerdau, 2003).

L'essence est une substance volatile odorante qui exsude de la fleur, de la feuille, du fruit et/ou de l'écorce, dépendamment de la plante. Les plantes

aromatiques présentent trois catégories principales d'organes sécréteurs de l'essence;

- Les poils glandulaires épidermiques dans le cas des Lamiacées, Verbénacées, Astéracées, et Moracées par exemple.
- Les glandes intra limbiques appelées « poches et canaux glandulaires » schizogènes chez les Myrtacées, (*Melaleuca, Myrtus, Eugenia* etc.) et les Hypericacées. Ainsi, la feuille du Millepertuis (*Hypericum perforatum)* semble à la lumière être percée de « mille trous », lesquels correspondent aux poches schizogènes vues par transparence, aspect retrouvé sur les feuilles de *Melaleuca alternifolia*.
- Les glandes schizolysigènes que l'on observe au niveau des feuilles et de l'épicarpe des fruits des Rutacées (*Citrus spp.*). Ce terme caractérise la forme de développement particulier des poches à essence, schizogène puis lysigène entrainant ainsi l'agrandissement des cellules (Franchomme *et al.* , 2001).

Ces systèmes sécréteurs se rencontrent dans différents organes végétatifs et reproducteurs tels que les sommités fleuries, l'écorce, les fruits, les feuilles, les graines et/ou les racines.

Outre des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires, la diversité moléculaire des métabolites contenus dans l'HE lui confère d'autres propriétés très variées qui permettront d'objectiver certains usages thérapeutiques (objectivation) lesquels devront impérativement être démontrés cliniquement. Postérieurement, l'industriel devra être soucieux de maintenir l' « identité moléculaire » de l'HE, outre le chémotype de la plante correspondante, – composant biochimique majoritaire - pour maintenir ses vertus en tant que produit fini ou ingrédient. En absence de démonstration clinique valide, les HE ne sont considérées qu'en tant qu'accompagnateurs thérapeutiques.

1.2. La distillation par entraînement à la vapeur

Ce mode de distillation est l'un des procédés d'extraction de l'HE les plus anciens. Il consiste en l'usage de la vapeur d'eau pour entrainer les molécules aromatiques, ce qui permet une extraction relativement respectueuse de l'intégrité de l'huile à une température inférieure à 100°C dans des conditions atmosphériques normales ce qui limite la pyrogénation de certains composés, particulièrement les esters.

Comme l'indique le schéma présenté dans la Figure 1, le matériel végétal est traversé par un flux de vapeur d'eau (4), laquelle éclate la structure des cellules végétales, libérant ainsi les molécules volatiles qu'elles contiennent en les séparant du substrat cellulosique (5). Cette vapeur chargée de molécules aromatiques se condense ensuite dans le serpentin ou condensateur, lequel se trouve dans une enceinte dont la température est maintenue froide avec un courant d'eau (6 et 7). L'essence et l'eau distillées se sépareront ensuite dans l'essencier ou vase de décantation. Ce processus impliquera le changement d'appellation « essence » à « huile essentielle » sous l'action de l'oxygène, de l'eau, de la vapeur d'eau, et de la température, lesquels impliqueront des modifications chimiques tels que l'oxydation et l'hydrolyse, facteurs additionnels à la diversification de la composition de l'huile d'un point de vue qualitatif. L'huile essentielle est ensuite séparée de l'eau aromatique ou hydrolat (appelé « hydrosol en anglais) (Franchomme *et al.* , 2001). Dans le cas de certaines espèces telle que la cannelle, (*Cinnamomum verum*), l'eau aromatique est réinjectée dans le distillateur afin de la saturer et de limiter ainsi la perte de molécules hydrosolubles. Cette méthode s'appelle la « cohobation ». Il existe d'autres modèles de distillateurs dans lesquels, la source de vapeur est située dans le même compartiment que le matériel végétal (4), directement en dessous de celui-ci.

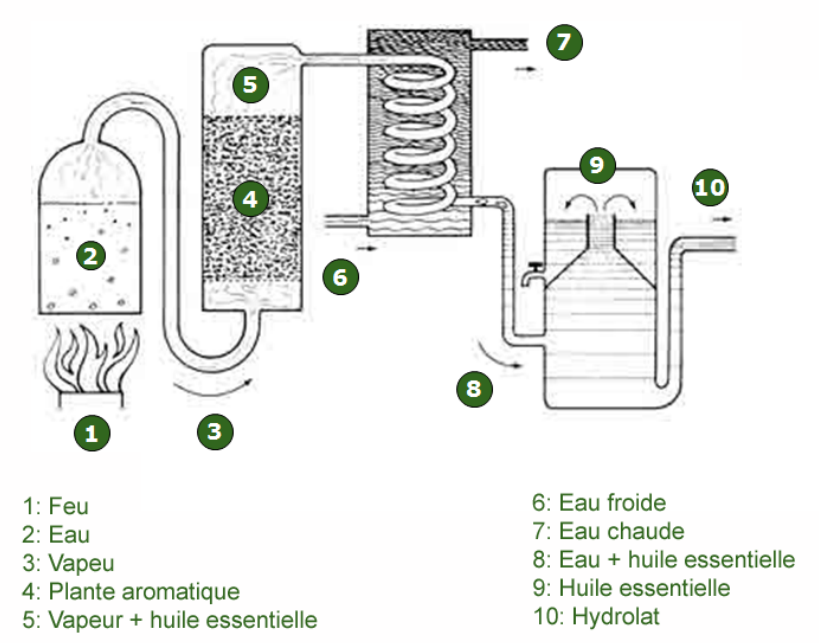


Figure 1. Schéma de la distillation à la vapeur d'eau
(Source : http://horsessentials.com/fr/content/20-aromatherapie-distillation)

1.3. Chémotype, identité moléculaire et facteurs de variation

Les HE correspondent à des mélanges de substances organiques volatiles qui appartiennent à différentes classes de composés tels que les hydrocarbures, esters, alcools, aldéhydes, certains acides, les phénols et leurs dérivés, les lactones etc. Ces différentes molécules sont des métabolites secondaires résultants de deux voies principales de biosynthèse ; celle des terpénoïdes, la plus commune et celle des phénylpropanoïdes.

La première voie métabolique débute avec l'IsoPenténylPyrophosphate (IPP), molécule à cinq carbones dérivée de l'acétyl Co A, issu lui-même du phosphoénolpyruvate (PEP) qui provient du glucose. La seconde voie aussi appelée voie du shikimate, fournit les acides aminés aromatiques entre lesquels la phénylalanine dérivée du PEP qui ouvrira la porte au métabolisme des phénylpropanoïdes. La Figure 2 résume ces différentes voies.

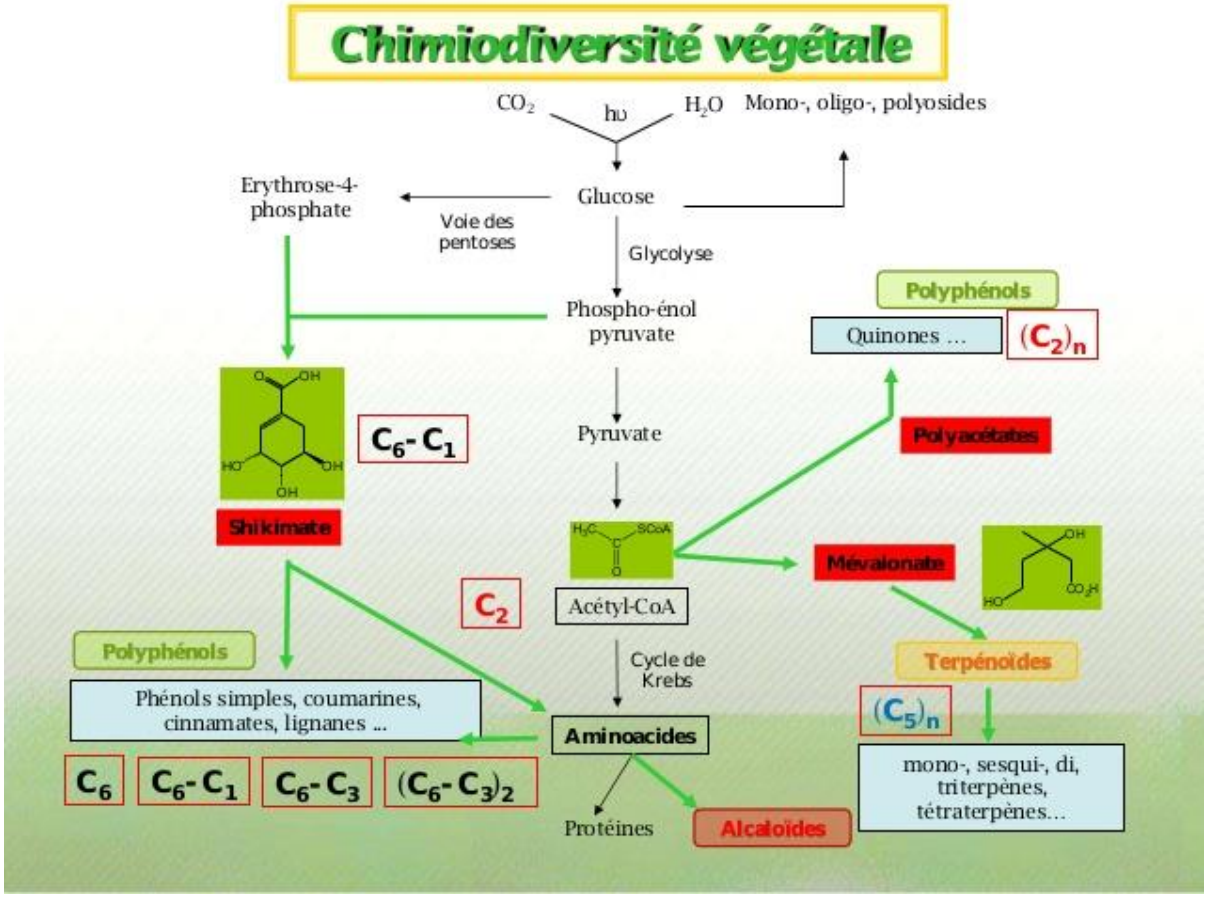


Figure 2. Résumé de différentes voies de Biosynthèse végétale (Michalet, 2015)

Les huiles essentielles d'une même espèce ou variété sont différenciées par le chémotype de la plante correspondante. Chémotype est un mot dérivé de chimiotype, correspondant au composant majoritaire dont l'action est influencée et complétée par des molécules secondaires (Couic-Marinier et Lobstein 2013). Les différences de type chimique peuvent être très importantes et impliquent par conséquent des changements considérables au niveau des propriétés chimiques et biologiques de l'huile essentielle et par conséquent de ses indications et contre-indications thérapeutiques. Le Thym présente, par exemple, 7 chémotypes différents : cinéol, géraniol, linalol, terpinéol, thuyanol, thymol et carvacrol. Chacune de ces molécules ont des propriétés qui leurs sont propres et qui peuvent parfois être antagonistes entre elles. Ceci implique l'importance de classifier les HE avec leurs chémotypes pour une utilisation plus sûre et efficace. Dans le domaine clinique « le terme "chémotype" est utilisé pour nommer la fonction alcool active principale de l'huile essentielle (Bonnafous, 2013).

Le thym, amplement utilisé, est un cas exemplaire dont la variabilité chimique est largement influencée par son environnement. Ainsi on rencontrera différents chémotypes ; thymol, carvacrol, géraniol, linalol, thuyanol-4 *et al*pha-terpinéol. Les résultats d'analyse de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) de 4 huiles essentielles de *Thymus vulgaris* confirment cette variation (Tableau 1). La différence de concentrations observées d'une huile à l'autre est flagrante. Par ailleurs, il est surprenant d'observer que l'huile de thym utilisée par Sacchetti *et al.* (2005) en tant que référence d'ailleurs, est caractérisée par le chémotype « thymol » avec un pourcentage en thymol de 6,84 et celle utilisée par Rota *et al* (2008) qualifiée par le même chémotype contient 8,23 fois plus de thymol.

Tableau 1. Pourcentages relatifs de molécules majoritaires d'huiles essentielles de Thymus vulgaris.

Huile essentielle (Chémotype)	**p-Cymène**	**γ-Terpinène**	**Carvacrol**	**Thymol**	**Référence bibliographique**
Thymus vulgaris (carvacrol)	10,6	13,5	73,7	NS	Kaloustian *et al.* , 2008
Thymus vulgaris (Non précisé)	34			52,9	Gutierrez *et al.* , 2008
Thymus vulgaris (Thymol)	18,7	1,9	2,8	57,7	Rota *et al.* , 2008
Thymus vulgaris (CH thymol)	15,3	5,63	7,96	6,84	Sacchetti *et al.* , 2005

Ces « chémotypes », bien que définis comme étant des types chimiques ne se réduisent néanmoins pas qu'à une seule molécule majoritaire contenue dans l'huile essentielle. Son étude et son usage ne devront donc pas omettre les autres métabolites secondaires qui constituent bien souvent plus de la moitié de l'ensemble des molécules de l'huile essentielle. Par conséquent, si la non-connaissance ou le non-respect des chémotypes peut être à l'origine d'échecs thérapeutiques dramatiques et d'accidents plus ou moins graves, liés par exemple à la neurotoxicité de phénols, il est tout aussi risqué et hasardeux de

ne se fier qu'à la seule première molécule majoritaire de l'HE sans considérer la complexité du *totum* moléculaire additionnel qui la constitue. Bien qu'il existe des règles spécifiques établissant des gammes de concentrations des molécules principales des HE tel que le défini l'Association Française de Normalisation (AFNOR), l'information concernant les indications thérapeutiques des différents chémotypes est particulièrement pauvre d'un point de vue normatif.

Cette ample diversité moléculaire rencontrée dans les HE, résulte de multiples facteurs interactifs, lesquels dérivent des conditions écosystémiques de la plante et des conditions d'extraction.

La Figure 3 présente ces différents facteurs dont plusieurs ont été étudiés par différentes équipes de chercheurs;

- **Saison** (Jordan *et al.* , 2006; Hussain *et al.* , 2008),
- **Climat** (Sangwan *et al.*, 2001),
- **Photopériodisme** ("Putievsky-E," n.d.; Sangwan *et al.*, 2001)**,**
- **Situation géographique** : altitude, pression et précipitations (Abu-Darwish & Abu-Dieyeh, 2009; Popovici *et al.*, 2008; Y. Zaouali *et al.*, 2005),
- **Stade Phénologique** (Lamy *et al.*, 1979; Naghdi Badi *et al.*, 2004; Sefidkon *et al.*, 2007; Nejad Ebrahimi *et al.*, 2008;)
- **Sol** (Moretti, Peana, Passino, & Solinas, 1998)
- **Irrigation** (Sangwan *et al.*, 2001)
- **Moment de la récolte; cycle lunaire et moment de la journée** (Naghdi Badi *et al.* , 2004; Omidbaigi, R., Kazemi, Sh., 2008; Corredor, 2006)
- **Transformation post-récolte et Déshydratation**
- **Conditions d'extraction** (Naderi-Hajibagher Kandi, 2011; Sefidkon *et al.*, 2007)

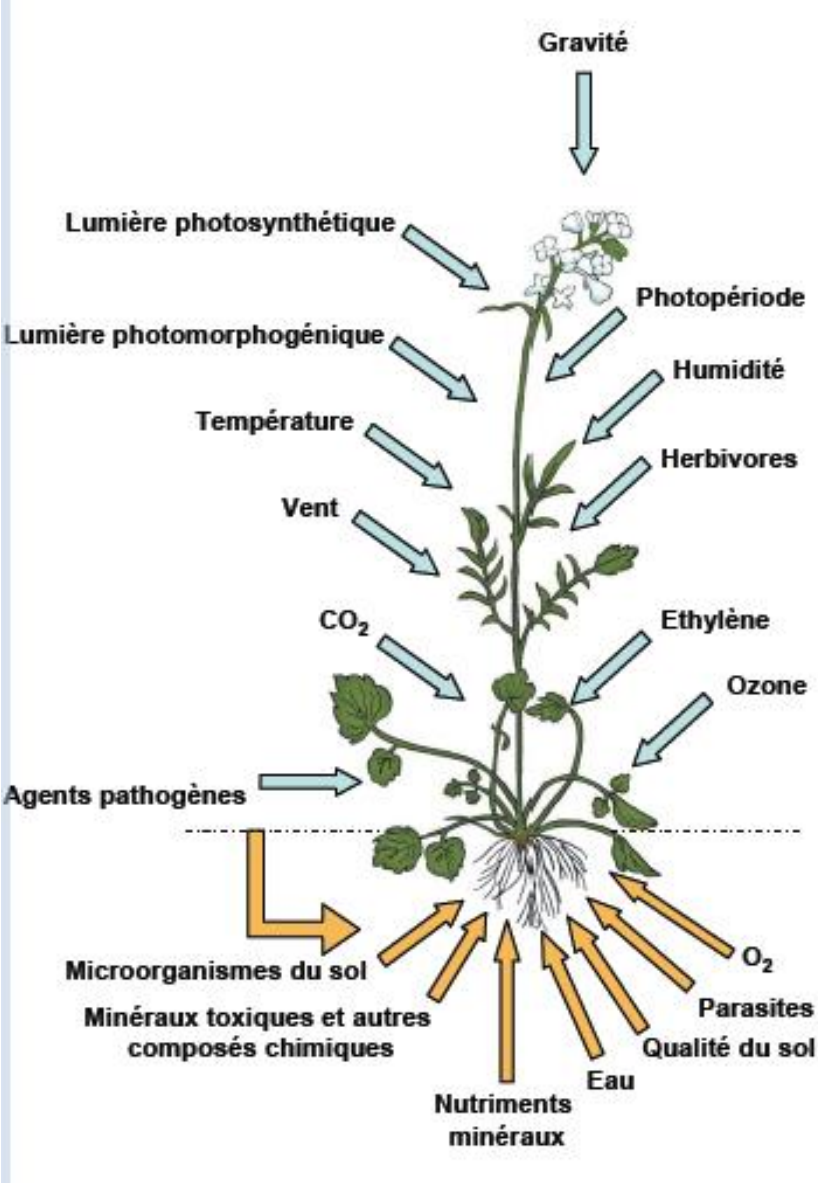


Figure 3. Signaux environnementaux de nature physique, chimique ou biologique, pouvant affecter la croissance et le développement des plantes (Buchanan et al. , 2000 in Hoffmann, 2003).

Dans les différents travaux de recherche concernant l'évaluation de bioactivité d'extraits végétaux provenant d'espèces cultivées ou sauvages bien que la caractérisation des méthodes appliquées pour les évaluations de bioactivité et de contenu phytochimique soient exhaustives, il n'en est pas de même pour la matière végétale utilisée, laquelle constitue l'objet principal de l'étude. La présentation de profils métaboliques constitue néanmoins une information primordiale pour analyser et interpréter correctement les résultats et pouvoir les comparer. Par conséquent, seules les publications présentant ces informations phytochimiques sont considérées dans ce document.

Dans le cas spécifique de *Thymus vulgaris,* Lamy *et al.* (1979) ont mis en évidence la variation du rendement et de la composition de l'HE obtenue par distillation par entrainement à la vapeur à différents stades de récolte (Figure 4). Une diminution du pourcentage relatif du p-cymène et du gamma-terpinène est observée au profit de l'augmentation des concentrations relatives du thymol – dont le p-cymène est précurseur - et du carvacrol – isomère du thymol qui ne diffère de lui que par la position ortho/meta du groupe hydroxyle - entre le stade bouton et celui de la fin de la floraison en passant par le stade floraison. Ce type d'étude doit être considéré à échelle industrielle afin d'optimiser le contenu en principes actifs des huiles et par conséquent leur indication thérapeutique ou celle du produit dans lequel elles sont utilisées. En effet, si l'on souhaite éviter au maximum des risques neurotoxiques liés par exemple à la présence de phénols comme le thymol ou le carvacrol, on donnera la priorité à la distillation de la matière végétale au stade bouton. L'effet relaxant du p-cymène sur les muscles lisses et le Système Nerveux Central sera alors optimisé car c'est à cette phase phénologique que sa concentration est la plus forte en comparaison avec les deux autres phases prises en considération par les auteurs : 32,1% au stade bouton et 17,8% à la fin de la floraison.

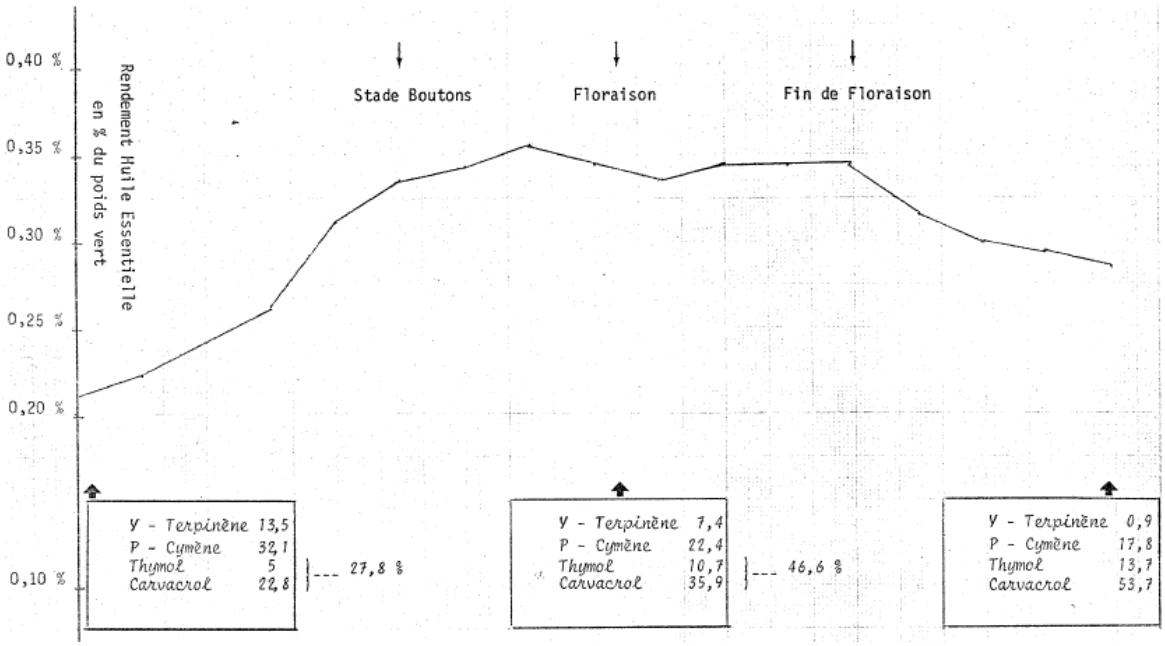


Figure 4. Rendement et composition de l'huile essentielle de Thymus vulgaris en fonction du stade de récolte (Lamy et al., 1979)

Outre l'importance de l'analyse phytochimique dans un cadre scientifique, il en est de même à échelle industrielle en termes de qualité et propriétés conséquentes des formules aromathérapeutiques dans lesquelles les huiles essentielles sont impliquées. De ce fait, la standardisation des processus productifs et le contrôle constant des contenus phytochimiques des huiles essentielles produites est un critère fondamental de sécurité et de qualité. De cette manière, l'industriel sérieux, éthique, peut garantir à sa clientèle, l'effet prophylactique ou thérapeutique de son produit aromathérapeutique.

1.4. Interaction entre l'HE et les solvants d'analyse

L'évaluation de la bioactivité d'une huile essentielle requiert une attention particulière compte tenu de son manque de solubilité dans l'eau. Lahlou (2004) reporte en effet que plusieurs auteurs recommandent l'usage de différents solvants afin de faire face à ce problème acétone, alcool, éthylène glycol, éthanol, méthanol, diméthyl sulfoxyde (DMSO) et diméthyl formamide (DMF). Par ailleurs, il propose aussi l'usage de détergents émulsifiants « tensioactifs » tels que le Tween 20 ou Tween 80 en pourcentages différents. (M Lahlou, Berrada, & Hmamouchi, 2001) reportent des résultats d'inhibition intéressants en utilisant le Tween 80 à 1% ou à 0.2% avec 30 HE différentes. Cependant, Remmal *et al.* (1993) démontrent que l'éthanol, le Tween 80, Tween 20 et le Triton X100 diminuent l'activité antimicrobienne des HE de *Thymus vulgaris, Syzygium aromaticum* et *Origanum vulgare* testées en milieu solide de même qu'en milieu liquide. Pour l'évaluation de cette bioactivité, les auteurs utilisent une suspension d'agar à 0.2% et observent des concentrations inhibitrices minimales et létales (MIC et MLC) inférieures à celles obtenues par d'autres auteurs ayant utilisé du Tween 80 ou de l'éthanol.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des HD et HE contre *Staphylococcus aureus* (Gram positif), *Escherichia coli* (Gram négatif), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif), *Candida albicans* et *Aspergillus niger* peut être réalisée soit par la méthode de diffusion en agar-agar (Acar & Goldstein, 1998) soit par celle de microdilution en bouillon de culture (Candan *et al.*, 2003).

Dans le cas des huiles essentielles, Lens-Lisbonne *et al.* (1987) ont décrit une méthode spécialement conçue pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles, laquelle consiste à préparer les huiles essentielles en solution aqueuse stérile d'agar-agar noble à 1%0 (m/v) et les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI), équivalentes aux plus faibles concentrations en huile essentielle ne donnant pas de croissance à l'œil nu sont ensuite définies par dilutions en bouillon Mueller-Hinton et lecture après 18 heures d'incubation à 37° C (Kaloustian *et al.*, 2008). Malgré les problèmes d'interaction HE-solvant mis en évidence par (Mouhssen Lahlou, 2004), Al-Bayati (2008) utilise le Diméthylsulfoxyde comme solvant pour réaliser les dilutions d'HE dans des microplaques de 96 puits dans lesquels sont versés 95 µL de Mueller Hinton et 5 µL d'inoculum bactérien.

Solomakos *et al.* (2008) diluent les échantillons à évaluer dans un bouillon de culture Trypto-caséine soja (Tryptic Soy Broth - TSB). Nedorostova *et al.* (2009) adaptent la méthode de volatilisation par disque, décrite par (López *et al.* (2005), laquelle consiste à appliquer les HE sur des disques de papier stériles. Dans ce cas, la mesure de la CMI est exprimée en microlitre d'HE par unité de volume de l'atmosphère « au-dessus des microorganismes ». Cette méthode semble être la plus appropriée pour travailler en milieu solide car elle considère l'évaporation de l'HE et l'effet conséquent. Cette même évaporation peut effectivement avoir des effets indésirables dans le cadre de la technique de diffusion par disque pour laquelle les effets des HE ne sont évalués qu'en deux dimensions par la mesure de l'auréole.

1.5. Activité conservatrice

Bien que différentes substances chimiques comme les fongicides ou les conservateurs ont permis à l'industrie de limiter ses pertes de produits finis, l'application de ces substances a aussi un impact sur l'environnement et la santé humaine (Y.-S. Kim, Hwang, & Shin, 2005). Par ailleurs, certains microorganismes ont développé des mécanismes de résistance rendant plusieurs molécules antimicrobiennes inutiles. Enfin, de manière indirecte, certaines substances synthétiques convertissent des matières ingérées en

substances toxiques ou carcinogènes en augmentant l'activité des enzymes microsomales (Farag, Daw, Hewedi, & El Baroty, 1989). Par conséquent, la demande en aliment sans conservateur ou en possédant une faible concentration est de plus en plus importante (Y.-S. Kim *et al.*, 2005), ce qui mène l'industrie à rechercher des alternatives plus saines et éco-conçues. Il existe à ce sujet, un intérêt particulier pour les polyphénols et phénols (Duthie & Crozier, 2000; Harborne & Williams, 2000; Tura & Robards, 2002), lesquels sont solubles dans l'eau et ont des propriétés de chélation avec les métaux (Kähkönen *et al.*, 1999; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1997), et sont des antioxydants ayant des propriétés redox qui leur permettent d'agir comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et de capturer les molécules d'oxygène singulets (Pietta, 2000). Leur importance dans le régime alimentaire humain et leur activité antimicrobienne a été établie durant les vingt dernières années (Rauha *et al.*, 2000).

Les HE constituent aussi une source importante de ces familles moléculaires, et plusieurs d'entre elles ont été étudiées pour leur activité antimicrobienne. Le nombre étudié est d'ailleurs inversement proportionnel aux applications que l'on peut trouver à échelle industrielle. Parmi les huiles étudiées, grand nombre d'entre elles sont dérivées d'épices comme *Thymus vulgaris, Cinnamomum zeylanicum, Satureia montana, Eugenia caryophylata*, *Origanum vulgare, Rosmarinus officinalis, Salvia officinalis, Cuminum cyminum* et *Syzygium aromaticum* (Belaiche, 1979; Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernández-López, & Pérez-Álvarez, 2008). De même, les HE de *Pelargonium sp., Monarda citriodora var. citriodora, Myristica fragrans, Origanum vulgare ssp. hirtum* et *Thymus vulgaris* ont été étudiées pour leur effet antioxydant (Damien Dorman, Deans, Noble, & Surai, 1995). Par ailleurs, l'acide carnosique, le carnasol, l'acide carsolique, le rosmaridiphénol et l'acide rosmarinique de *Rosmarinus officinalis* ont démontré avoir aussi une activité antioxydante. Cependant, malgré une haute activité antioxydante, ces HE présentent l'inconvénient d'être peu solubles dans l'eau, ce qui affecte certaines formules industrielles (Lis- Balchin, Steyrl, & Krenn, 2003).

Les HE contiennent principalement des monoterpènes et sesquiterpènes lesquels respectent la formule général $(C5H8)_n$ et incluent les alcools,

aldéhydes, esters, éthers, cétones, phénols et oxydes. Plus de 1000 structures différentes de monoterpènes et plus de 3000 de sesquiterpènes sont reportées (Svoboda & Hampson, 1999). Leur utilisation en tant qu'antimicrobiens s'inspire de leur rôle au sein de la plante face aux phytopathogènes. Plus la complexité moléculaire de l'HE est élevée plus elle constitue un obstacle important pour l'adaptation pathogène que ne le ferait un mélange simple de monoterpènes. Cette théorie est argumentée dans le cadre de différentes recherches réalisées par Carlton *et al.* , (1992) et Svoboda (1998), en testant l'HE de *Myrica gale* contre un large spectre d'espèces de champignon.

De nombreuses études démontrent la relation entre la composition chimique des HE et leurs activités sur les microorganismes ainsi que leur effet additionnel en tant qu'antioxydant (Youdim & Deans, 1999), ce qui constitue une option polyvalente intéressante pour combattre la détérioration de l'aliment par des microbes ou par les radicaux libres. Cependant, malgré le fait que plusieurs de ces HE proviennent de plantes utilisées comme condiment et que leur concentration soit relativement faible, elles peuvent tout de même affecter les propriétés organoleptiques des aliments traités (Nedorostova *et al.*, 2009). Par conséquent, l'étude des HE dans le cadre d'applications concrètes doit être réalisée dans des modèles qui permettent aussi d'évaluer leur impact sur l'arôme et le parfum du produit fini. Par ailleurs, Burt (2004) mentionne que de plus fortes concentrations d'HE sont nécessaires pour reproduire le même effet dans le produit fini, ce qui peut donc impliquer certains risques qui doivent être contrôlés.

De même, dans le domaine des antioxydants, les HE font aussi l'objet de nombreuses recherches tant pour leurs vertus potentielles en tant que conservateurs que pour des raisons préventives et thérapeutiques en santé humaine en tant qu'agents antioxydants et cytostatiques sur des cellules de tumeurs (Svobodan & Hampson 1999). Pasqua et Feo, (2005) n'utilisent volontairement qu'une concentration maximale de 1% d'HE dans leurs essais compte tenu de la recommandation de Smith-Palmer *et al.* (1998) concernant le pourcentage maximum d'HE utilisable dans les aliments non seulement pour des raisons de sécurité mais aussi pour limiter la saveur apportée par ces dernières aux aliments. Les activités antimicrobienne et antioxydante des

plantes étudiées dans le cadre de cette thèse sont présentées de manière détaillée dans le chapitre 2.

1.6. Interactions : synergie, additivité, antagonisme et indifférence

Le tout est plus grand que la somme des parties (Confucius)

« Malheureusement, aujourd'hui, l'industrie pharmaceutique produit le principe actif par synthèse chimique et le vend plus cher, maugrée le pharmacien. Pourtant, parfois l'expérience nous montre que la molécule synthétisée n'est pas aussi efficace que le mélange de substances extraites, car il existe une espèce d'émulation entre les différents produits. En plus, elle risque d'entraîner une résistance des bactéries, alors qu'un assemblage de produits naturels n'en engendre pas. »

(Jean-Marie Pelt, (les Dons précieux de la nature, 2010),

Les notions de synergie, additivité, antagonisme et indifférence dans le domaine des huiles essentielles sont observables dans différents cas de figures :

a. Intraspécifique à travers l'émulation entre les molécules d'un même extrait pour obtenir une ou plusieurs activités biologiques.
b. Interspécifique résultante du mélange moléculaire de 2 ou plusieurs extraits végétaux, laquelle peut aussi avoir un impact sur une ou plusieurs activités biologiques.

Il existe des études portant sur l'interaction des huiles essentielles avec d'une part les ingrédients qui composent l'aliment et les conditions de ce dernier, tel que le pH (Jorge Gutierrez *et al.*, 2008) ou l'acide lactique (Dimitrijević, Mihajlovski, Antonović, Milanović-Stevanović, & Mijin, 2007), d'autre part leur combinaison avec un antibiotique tel que la nisine (Govaris, Solomakos, Pexara, & Chatzopoulou, 2010) ou le fluconazole (Khan & Ahmad, 2011) et enfin, l'interaction des huiles essentielles entre elles (Al-Bayati 2008;

Dimitrijević *et al.* 2007; Gutierrez *et al.*, 2009; Gutierrez *et al.* 2008). Cependant, les travaux de recherche, concernant ces dernières interactions, sont peu nombreux.

Les travaux de Gutierrez *et al.* (2008 et 2009), donnent suite aux travaux de Pasqua and Feo (2005) qui réalisent un screening d'HE sur 12 bactéries et mettent en évidence une relation entre la composition d'un aliment et l'efficacité antimicrobienne d'HE et de mélanges d'HE telles que *Thymus vulgaris, Origanum majorana*, *Rosmarinus officinalis, Salvia triloba, Melissa officinalis, Ocimum basilicum,* sélectionnées de telles manière que les caractéristiques sensorielles de l'HE intégrée soit acceptable dans l'aliment tout en assurant la conservation de ce dernier face à quatre bactéries ; *B. cereus, E. coli, L. monocytogenes, P. aeruginosa* (Pasqua & Feo, 2005). D'après les auteurs, les HE sont plus efficaces lorsqu'elles sont appliquées sur des préparations alimentaires prêtes à l'emploi contenant de hautes concentrations de protéines et de faibles concentrations en graisses et carbohydrates avec un pH acide.

Les combinaisons d'HE peuvent aussi contrôler des bactéries reconnues pour être particulièrement résistantes aux antimicrobiens d'origine végétale telles que *Pseudomonas spp* (Hammer *et al.* , 1999; Holley & Patel, 2005). Néanmoins, l'usage d'HEs représente un challenge qui consiste à utiliser de faibles concentrations afin de maintenir la sécurité du produit, sa durée de vie utile tout en diminuant les aspects sensoriels de l'HE dans le produit fini (J Gutierrez *et al.*, 2009).

La synergie, l'antagonisme, l'addition et l'indifférence se différencient en appliquant la méthode de grille de cotation (Checkerboard) en utilisant des plaques de 96 puits comme décrit précédemment (Schelz, Molnar, & Hohmann, 2006) afin d'obtenir l'indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire (CIF ou FIC en anglais : Fractional Inhibitory Concentrations) avec différentes concentrations des extraits A et B. L'indice CIF est calculé de la manière suivante ; CIF= CIFA+ CIFB où CIFA et CIFB sont les CIF respectives de A et B ; CIFA est égale à CMIA en combinaison divisé par CMIA seule et de même pour CIFB où CMI correspond à la Concentration Minimale Inhibitrice de A. Selon le type d'interaction entre l'extrait A et l'extrait B sera interprété de la

manière suivante dépendamment de la valeur de CIF: CIF≤0.5: Synergie (S); 0.5<CIF≤1: Additivité (A); 1<CIF<2 Indifférence (I); CIF≥2: Antagonisme (Ag) (EUCAST, 2000).

Dans l'étude de Gutierrez *et al.* (2008), la seule combinaison ayant démontré les meilleurs résultats d'efficacité est celle d'HE de *Thymus vulgaris* avec celle de *Origanum vulgare* avec une concentration d'inhibition plus intéressante que les HE seules. Cependant, les auteurs précisent que même si les combinaisons n'ont montré aucun effet de synergie, en utilisant des concentrations plus faibles que celles requises pour les HE seules, ces combinaisons présentent un potentiel pour des applications industrielles afin d'étendre la durée de vie utile des aliments sélectionnés.

Gutierrez *et al.* (2008) observent des effets d'additivité de la part de toutes les combinaisons évaluées avec l'HE de *Origanum vulgare* contre *Bacillus cereus,* de même que pour les combinaisons de *Ocimum basilicum* et *Thymus vulgaris* contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les auteurs expliquent ces résultats considérant l'efficacité des composés principaux des HE individuelles comme c'est le cas par exemple pour le carvacrol et/ou le thymol de *Origanum vulgare* et *Thymus vulgaris*. De même, le camphre et l'eucalyptol de *Rosmarinus officinalis* et *Salvia triloba* sont des molécules ayant des fonctions oxygénées reconnues pour accroitre les propriétés antimicrobiennes des terpénoïdes (Naigre, Kalck, Roques, Roux, & Michel, 1996).

Le carvacrol et le thymol en combinaison ont un effet additif contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001). Nazer *et al.* (2005) observent le même phénomène en mélangeant le thymol avec le carvacrol, mais aussi avec d'autres composés aromatiques tels que le citral, l'eugénol et le géraniol et n'observent pas non plus d'effet de synergie contre *Salmonella*. Par contre, Ultee *et al.* (2000) **observent un effet de synergie entre le carvacrol et son précurseur le p-cymène,** lequel malgré une faible activité antibactérienne, gonfle la membrane cellulaire plus que le carvacrol ne le fait. En 2002, le même auteur principal approfondit le mécanisme d'action du carvacrol et observe que ce composé pénètre dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaines d'acide gras. Cette

déformation structurelle augmente donc la fluidité membranaire affectant sa perméabilité. Les bactéries exposées à cette molécule présenteront une diminution de l'ATP intracellulaire et une diminution du potentiel membranaire. La diminution de l'ATP intracellulaire est due en réalité à la fuite de protons provoquées par le carvacrol qui provoque la chute de la force protomotrice et donc la synthèse de l'ATP (Ultee, Bennik, et Moezelaar 2002).

Il est aussi possible que le p-cymène facilite l'entrée du carvacrol dans la cellule. La forte activité antioxydante du thymol et du carvacrol en tant que réducteurs du radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et inhibiteur de la peroxydation lipidique (Bruneton, 1999) devrait aussi laisser espérer des résultats intéressants pour cette activité biologique de la part de combinaisons de plantes qui contiennent ces deux molécules.

Suite à l'étude de l'inhibition des champignons phytopathogènes *Alternaria mali* et *Botrytis cinerea* par l'huile essentielle et l'hydrolat de *Satureja hortensis* L, Boyraz & Ozcan (2006) ont conclu que le mélange de l'hydrolat, l'oléorésine et l'huile essentielle peut être efficace pour inactiver des microorganismes dans les plantes ou les aliments.

Faleiro *et al.* (2003) ont démontré que l'activité antimicrobienne des HE de *Thymus mastichina, T. camphoratus* et *T. lotocephalus* contre *Candida albicans, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Proteus mirabilis, Salmonella spp.* et *Staphylococcus aureus,* ne serait pas due à l'action d'une seule molécule. Les auteurs utilisent du linalool et du 1,8 cinéole et un mélange des deux molécules (1:1), lesquelles font partie des molécules majoritaires dans les HE précédentes.

Peu de recherches ont été réalisées concernant la bioactivité de mélanges de différents extraits (aqueux, alcoolique, huile essentielle, hydrolat etc.) d'une seule plante ou de plusieurs afin d'améliorer le contenu phytochimique et par conséquent la bioactivité résultante d'une éventuelle synergie.

Bassolé et Juliani (2012) ont réalisé une revue très exhaustive concernant les propriétés antimicrobiennes de combinaisons d'HE. Dans leur revue, le binôme de scientifique présente le type d'interaction antimicrobienne d'une liste de combinaisons d'HE et de combinaisons de quelques molécules aromatiques telles que le carvacrol, thymol, eugénol, 1.8-cinéole, myrcène entre autres. Le

Romarin et le Thym apparaissent aussi dans cette liste, cependant leur combinaison n'est pas relevée. La combinaison d'une espèce du genre *Lippia*, *L. multiflora* avec *Mentha piperita* et *Ocimum basilicum* y est aussi reportée. La première présente un effet de synergie contre *E. coli*.

Différentes méthodes sont appliquées pour définir le type d'interactions antimicrobiennes entre deux composés ou entre deux huiles essentielles en appliquant des techniques de macro ou micro dilution. La méthode de checkerboard est la plus fréquemment utilisée. Elle consiste à utiliser une plaque de 96 puits en l'organisant comme un graphique ayant en abscisse différentes concentrations de la substance A et en ordonnée différentes concentrations de la substance B. Les résultats de cette méthode sont ensuite suffisants pour élaborer un graphique en deux dimensions portant sur chaque axe la concentration d'un composé, appelé isobologramme (Altenburger, Bödeker, Faust, & Grimme, 1990). Les isoboles sont les courbes qui relient entre elles différentes combinaisons de concentrations des deux molécules. La ligne droite représente les points correspondants à l'effet d'addition des deux substances (Figure 5). Cette droite relie les deux points en abscisse et ordonnée correspondants aux valeurs requises pour obtenir l'effet désiré. Une déviation au-delà de cette droite exprime un effet antagonique entre les deux substances et la déviation en deçà traduit un effet synergique.

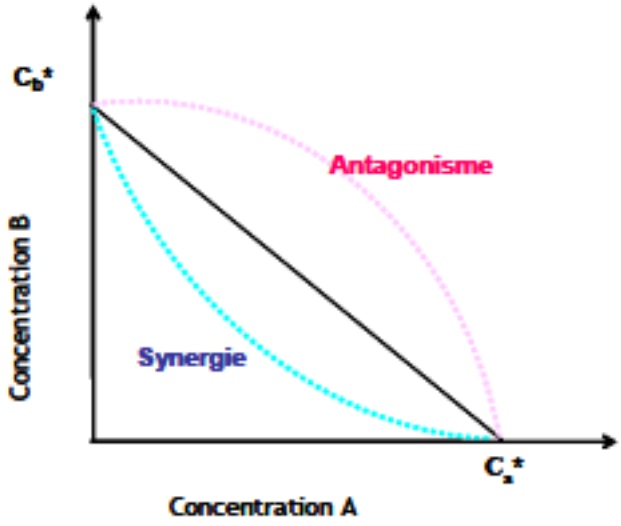


Figure 5. Un isobologramme schématique (Zeman, 2008)

Bassolé et Julian (2012) ont compilé les différentes gammes de valeurs d'interprétation du type d'interaction entre deux substances reportées par plusieurs auteurs dépendamment des valeurs de Concentrations Fractionnaires Inhibitrices obtenues (Tableau 2). Les auteurs y considèrent la notion d'indifférence, laquelle n'est pas considérée dans la représentation graphique de l'isobologramme précédente. Seuls Pei et al. (2009) proposent un index respectant l'interprétation de l'isobologramme d'Altenburger et al. (1990) à laquelle les auteurs n'ajoutent que la notion d'indifférence correspondant à des valeurs de Concentrations Fractionnaires Inhibitrices (CFI ou FIC en anglais) comprises entre 1 et 2.

Les indices de Concentration Fractionnaire Bactéricide (CFB ou FBC en anglais) et de Concentration Fractionnaire Fongicide (CFF) reportés par Gutierrez *et al.*(2008a) et (EUCAST, 2000) sont calculés en utilisant les équations suivantes pour chacune des activités microbicides :

$CFB = CFB_A + CFB_B$, où

CFB_A = (CMB_A combiné) / (CMB_A non combiné)

CFB_B = (CMB_B combiné) / (CMB_B non combiné)

Comme l'ont reportés Bassolé et Juliani (2012), l'interprétation de l'interaction de substances dans une combinaison, dépend d'une part de la méthode utilisée et d'autre part des paramètres appliqués pour interpréter le type d'interaction. Les auteurs ont présenté une comparaison intéressante entre différents indices de Concentration Fractionnaire Inhibitrice (CIF) utilisés pour déterminer le type d'interaction et ont reporté par exemple qu'une synergie pouvait être considéré avec une CIF inférieure à 1 par certains auteurs, et inférieur à 0.5 ou 0.75 par d'autres.

Une synergie interprétée avec une valeur de FIC inférieure à 1 serait interprétée de même avec la méthode de l'isobologramme. Cependant, dans ce travail de recherche la corrélation entre CIF et CFB et l'effet de combinaisons d'agents antibactérien » présenté par l'EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) a été considéré comme référence officielle (EUCAST, 2000).

Tableau 2. Indices de Concentration Fractionnaire Inhibitrice utilisés pour déterminer le type d'interaction (Bassolé et Juliani 2012).

FIC index				References
Synergy	Addition	Indifference	Antagonism	
<1	1	1–2	>2	Pei *et al.* [54]
<0.5	0.5–1	1–4	>4	Schelz *et al.* [75], Gutierrez *et al.* [20,65], Bassole *et al.* [30,66]; Tserennadmid *et al.* [62]
≤0.5	0.5–1	1–4	>4	Mulyaningsih *et al.* [60]
<0.5	0.5–4	-	>4	Zore *et al.* [76]; Goni *et al.* [64]
≤0.5	0.5–1	-	>1	Rosato *et al.* [77]
≤0.75	0.75–2	-	>2	Galluci *et al.* [55]
<0.9	0.5–1,1	-	1.1	Romano *et al.* [78]

1.7. La règlementation européenne de l'usage des Huiles Essentielles

Dans les aliments, les HE sont le plus souvent utilisées pour aromatiser. De ce fait, elles sont donc concernées par la directive 88/388/CEE du 22 juin 1988 relative au rapprochement des législations des Etats membres dans le domaine des arômes destinés à être employés dans les denrées alimentaires et des matériaux de base pour leur production. Les annexes I et II de cette directive présentent des listes de substances interdites d'emploi direct, mais dont la présence est tolérée avec limitation dans les denrées alimentaires aromatisées. Dans ces listes, on peut trouver certaines substances présentes dans les HE comme la coumarine, la pulégone ou le safrole. Cette directive a ensuite été transposée par le décret 91-366 du 11 avril 1991 et l'arrêté du 11 juillet 1991. Finalement, en 1999, un répertoire de substances aromatiques utilisées dans la Communauté européenne est publié dans la décision 1999/217/CE, laquelle sera ensuite modifiée par la DÉCISION DE LA COMMISSION du 26 février 2009 en ce qui concerne le répertoire des substances aromatiques utilisées dans ou sur les denrées alimentaires [notifiée sous le numéro C(2009) 1222] (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) (2009/163/CE)

L'évaluation de ces substances continue et certaines d'entre elles comme le méthyleugénol et l'estragol par exemple ont finalement été interdites en tant que telles dans les arômes et dans les denrées alimentaires excepté si ces molécules sont présentes dans les HE (Décision 2002/113/CE du 23 janvier 2002).

Les spécialités pharmaceutiques à base de plantes ou d'HE sont soumises à la règlementation régissant les médicaments en tant que « médicament traditionnel à base de plantes » dont les critères sont définis par l'ordonnance n° 2007-613 du 26 avril 2007 (Chapitre 1er, article 2). Le décret n° 2007-1198 du 3 août 2007 relatif à la liste des huiles essentielles dont la vente au public est réservée aux pharmaciens énumère une quinzaine d'huiles essentielles, précisant les noms vernaculaires et les dénominations botaniques des plantes (selon le Code de la Santé Publique (CSP), art. D. 4211-13.

La directive 2004/24/CE du 31 mars 2004, relative aux médicaments traditionnels à base de plantes, couvre les produits (médicaments ou non) présents sur le marché, à des fins médicales, dans un pays de l'Union européenne depuis au moins 30 ans (ou depuis au moins 30 ans sur le marché d'un pays tiers et depuis 15 ans sur le marché d'un pays de l'Union européenne). Ces produits doivent avoir démontré leur innocuité et avoir une efficacité plausible du fait de leur usage et leur longue expérience.

Les produits à base d'huiles essentielles répondant à ces critères entrent dans le champ de cette directive. Le comité sur les médicaments à base de plantes créé au sein de l'Agence européenne du médicament établit des monographies et une liste communautaire de plantes ou préparations à base de plantes permettant la délivrance d'enregistrement des médicaments traditionnels à base de plantes sur la base de la procédure de reconnaissance mutuelle. De plus, lorsqu'une plante ou préparation à base de plante est inscrite sur la liste communautaire, les mentions accompagnant cette inscription s'imposent aux États membres sans qu'aucun complément relatif aux dossiers clinique et préclinique ne puisse être exigé.

La Directive 2004/24/CE du 31 mars 2004 modifiant la directive 2001/83/CE concerne les médicaments traditionnels à base de plantes et par conséquent les produits pharmaceutiques contenant des HE. Le comité sur les médicaments à base de plantes (HMPC) a été créé au sein de l'Agence européenne du médicament (EMA) depuis novembre 2004. Ce comité établit des monographies et une liste communautaire de plantes ou préparations dérivées qui permet la délivrance de leur enregistrement sur la base de la procédure européenne de reconnaissance mutuelle. « Lorsqu'une plante ou

préparation à base de plantes est inscrite sur la liste communautaire, les mentions accompagnant cette inscription s'imposent aux Etats-membres sans qu'aucun complément relatif aux dossiers clinique et préclinique ne puisse être exigé.

En 2007, l'AFSSAPS crée le groupe de travail Pharmacopée - huiles essentielles dont la mission est d'élaborer les projets de monographies et de préparer les avis de la Commission de la pharmacopée dans son domaine de compétence (Décision du 8 juin 2007). Puis la Décision DG n° 2013-362 du 30 octobre 2013 portant nomination auprès du Comité français de la Pharmacopée "plantes médicinales et huiles essentielles" à l'ANSM laquelle remplace finalement l'AFSSAPS. Il n'existe pas de règlementation spécifique concernant l'usage des HE en tant que *totum* moléculaire dans les produits cosmétiques et médicaments. La législation porte sur leurs molécules considérées à part entière.

Le 14 octobre 2010, la Commission de cosmétologie de l'AFSSAPS adopte le document « Recommandations relatives à l'évaluation du risque lié à l'utilisation des huiles essentielles dans les produits cosmétiques ». Ce document complète le document « Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles - Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles » (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), 2008), et présente ci-après, différentes recommandations à prendre en considération concernant l'évaluation du risque lié à l'utilisation des huiles essentielles.

Dans le cas des produits cosmétiques, les HE sont concernées par l'arrêté du 6 février 2001 lequel transpose l'annexe II de la directive 76/768/CEE. Cette directive n'est plus en vigueur actuellement on parle de régulation CLP (pour Classification, Labelling et Packaging). Cet arrêté présente la liste des substances qui ne peuvent entrer dans la composition des produits cosmétiques. C'est le cas, par exemple, du méthyleugénol dont l'usage est conditionné dépendamment de sa concentration dans le produit fini. Ainsi, le méthyleugénol (n° CAS 93-15-2), est interdit dans les produits cosmétiques sauf s'il s'agit de méthyleugénol naturellement présent dans les extraits et les HE et sous réserve que sa concentration n'excède pas :

- 0,01 % dans les parfums fins
- 0,004 % dans les eaux de toilette
- 0,002 % dans les crèmes parfumées
- 0,001 % dans les produits rincés
- 0,0002 % dans les autres produits non rincés et les produits d'hygiène buccale

Lors du processus de demande d'autorisation de la mise sur le marché, il est fondamental de vérifier les exigences règlementaires mises à jour par la directive et transposées par l'**arrêté du 6 février 2001** mentionné ci-avant, lui-même modifié par **l'arrêté du 17 novembre 2004** lequel exige depuis le 11 mars 2005 que la présence de 26 substances « ayant un potentiel sensibilisant chez l'homme » inscrites à **l'annexe III de la directive 76/768/CEE** doit être indiquée sur l'étiquette du produit fini lorsque leur concentration excède un certain seuil. Cette obligation, concerne les produits cosmétiques qui contiennent plus de 10 ppm de l'une de ces 26 substances pour les produits non rincés et 100 ppm pour les produits rincés (AFSSAPS, 2008). **Le citral, l'eugénol, le géraniol, le linalol et le citronellol font partie de ces 26 substances**.

L'arrêté du 7 août 2008 transpose les dispositions de la directive 2008/42/CE et modifie l'arrêté du 6 février 2001. Cet arrêté présente une liste de substances – entre lesquelles sont cités l'isoeugénol, et le d-limonène - pouvant être retrouvés dans les HE et qui ne peuvent être utilisés dans les produits cosmétiques en dehors de certaines restrictions et conditions précisées dans l'annexe 3 de la directive.

Par ailleurs il est important de consulter **l'annexe I de la directive 67/548/CEE**, laquelle présente une liste de substances classées comme cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction, de catégories 1, 2 et 3 qui sont interdites dans les produits cosmétiques. Cependant, une substance de la catégorie 3 peut être utilisée dans les produits cosmétiques si elle a été évaluée par le SCCP[1] (Scientific Committee on Consumer Products)

[1] Le SCCP (*Scientific Committee on Consumer Products*) décrit les données toxicologiques requises concernant les ingrédients cosmétiques (Commision européenne, 2006).

et que celui-ci l'a jugée apte à être utilisée dans les produits cosmétiques (AFSSAPS, 2010).

Dans le cas spécifique des conservateurs utilisables dans les produits cosmétiques, l'**annexe VI de la directive 76/768/EC** précise que certaines substances utilisées dans la formulation de produits cosmétiques peuvent aussi avoir des propriétés antimicrobiennes et par conséquent participer à la conservation du produit comme par exemple, les huiles essentielles et quelques alcools. Cependant ces substances ne sont pas inclues dans la liste des conservateurs présentés. Cette annexe est remplacée par l'**annexe V de la régulation CLP**, lequel présente la « liste des agents conservateurs admis dans les produits cosmétiques ».

La base de données de l'IFRA (http://www.ifraorg.org/en-us/standards_restricted/s2) présente aussi trois niveaux de standards dont la concentration autorisée varie selon le type de produit. Par exemple dans cette base, le linalol et le limonène n'ont pas de niveau maximum. Par contre, la concentration du citral que l'on trouve dans les huiles essentielles de plantes du genre *Citrus* est limitée à 0.3% dans un produit de catégorie 5 (Crème de mains). Cette base de donnée présente aussi une information similaire dans le cas de certaines huiles essentielles comme celle du Citron (*Citrus limonum*) par exemple, dont la concentration ne peut être supérieure à 2% excepté dans le cas de produits rincés. Une fois ces informations vérifiées pour chacune des molécules majoritaires des huiles essentielles, on obtient alors des valeurs de concentration qui constituent des critères à ne pas dépasser dans les formules finales qui seront soumises aux « challenge test » qui permettront de mettre en évidence la durée de vie utile du produit fini.

2. Les hydrolats

2.1. Définition

On appelle « eau aromatique » (à ne pas confondre avec eau aromatisée) ou « hydrolat » (HD) ou « eau distillée florale » le distillat aqueux qui subsiste après l'entraînement à la vapeur d'eau, une fois la séparation de l'huile essentielle effectuée (AFSSAPS). En anglais, le terme hydrosol est utilisé pour nommer les hydrolats et dans le domaine de l'aromathérapie, les noms « eaux florales » et « eaux de plantes » sont aussi utilisés.

Adelon (1835) nommait les HD « eaux distillées médicinales », lesquelles sont « plus ou moins odorantes ». Ils différencient celles qui se distinguent par une odeur forte et plus fragrante, les eaux aromatiques –« elles paraissent devoir leur odeur à une certaine quantité d'huile volatile ». C'est le cas des eaux de rose, de fleur d'oranger, de romarin etc. Par ailleurs les hydrolats peuvent être obtenus de plantes qui apparemment ne contiennent pas d'huile essentielle comme le muguet, la tubéreuse etc. La nature du "principe odorant" de ces eaux était à cette époque inconnue. C'est le cas des eaux de laitue, Morelle etc. La conservation des hydrolats dépend de leur contenu en huiles essentielles lesquelles permettent d'augmenter leur stabilité.

Les quantités relatives d'eau et de plante varient selon les matières végétales utilisées. Les auteurs préconisent qu'ordinairement on prend 5 parties de plantes pour 20 d'eau et l'on distille jusqu'à ce que 10 parties de liquide soient passées. Ils ajoutent : « Ces proportions sont indiquées dans le nouveau Codex de Paris pour les eaux de rose, de mélisse, de tilleul, de romarin, de fleur d'oranger etc. Dans le cas des plantes peu odorantes, il est d'usage d'augmenter la quantité de plantes et souvent même de cohober c'est-à-dire de redistiller plusieurs fois le distillat aqueux, comme dans le cas des eaux de laitue, de pariétaire et de pourpier. Par ailleurs, les auteurs mentionnent qu'il est parfois nécessaire de précéder la distillation de la macération ou de l'infusion prolongée pendant plusieurs heures dans le cas de substances dont le tissu dur et serré ne se laisse pas facilement pénétrer par l'eau comme c'est le cas des bois de Rhodes, de sassafras, des écorces de cannelle, de cascarille, de girofle, etc.(Adelon, 1835).

Le CODEX Français (Orfila *et al.*, 1837) utilise le terme d'eaux distillées ou hydrolats lesquels sont différenciés en deux catégories dépendamment de leurs usages ;

- Les bases ou excipients: Hydrolats de Thym et Romarin.
- Les Principes Actifs Thérapeutiques tels que l'hydrolat d'Amande (*Amygdalus communis*) aux vertus purgatives et vermifuges.

Adelon *et al.* (1835) précisent que lorsque les hydrolats sont pauvres en HE, ils sont particulièrement instables et ceux riches en HE pourront être conservés pendant plusieurs années. D'un point de vue moléculaire, les composés principaux de l'hydrolat sont en général les mêmes que ceux qui sont présents dans la fraction oxygénée de l'HE correspondante (Price & Price, 2004), lesquels sont responsables de l'odeur de cette solution aqueuse. Au niveau scientifique et industriel il n'existe pas de définition légale, de standards proposés par l'industrie ou la communauté scientifique internationale ou de spécifications de la part d'organismes internationaux comme ISO ou AFNOR (Tannous, Juliani, Wang, & Simon, 2004).

Les hydrolats sont utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique. C'est le cas par exemple de l'eau de rose et l'eau de fleur d'oranger utilisées non seulement pour le soin de la peau ou dans la préparation de gâteaux et boissons.

Contrairement aux huiles essentielles, il existe peu de travaux portant sur la composition chimique et l'activité biologique des hydrolats. A cet égard, Aazza *et al.* (2011) présente la liste des équipes de chercheurs qui ont étudié l'un de ces sujets ; Paolini *et al.* , 2008, Lis-Balchin *et al.* , 2003; Sağdiç and Özcan, 2003; Boyraz and Özcan, 2005; Özcan *et al.* , 2008; Ulusoy *et al.* , 2009).

L'équipe de Inouye (2008) doit aussi être mentionnée dans le domaine des hydrolats compte tenu de l'étude comparative importante qu'elle a réalisée sur 44 hydrolats et leurs HE respectives. Cependant, cette étude ne présente pas la méthode d'obtention des hydrolats et tout spécialement le rapport masse végétale versus volume d'hydrolat obtenu. Par ailleurs, il est important de noter dans cette étude que le composé majoritaire dans l'HE n'est pas systématiquement celui qui est présent dans l'hydrolat. C'est le cas par exemple de *Eucalyptus citriodora* dont le composé majoritaire dans l'HE est le

citronellal alors que dans l'hydrolat c'est le cis-p-menthane-3,8-diol qui présente la concentration majoritaire. La même observation est réalisée pour *Chamaecyparis obtusa.*

Dans cette dernière étude, le thymol est le composé majoritaire avec respectivement des pourcentages de 79.2 et 37.0 dans l'HD et l'HE. Par contre le paracymène présent avec un pourcentage de 32.5% dans l'HE est absent dans l'HD. Dans le cas de *Rosmarinus officinalis*, bien que l' α-Pinène (25.4%) soit présent en majorité dans l'HE suivi par le 1,8 cinéole (17.8%), il est absent dans l'HD dans lequel le composé majoritaire est la verbénone (23.1%) suivie du camphre (21.9%) et du 1,8 cinéole (19.0%).

En ce qui concerne les rendements d'obtention des hydrolats, Bonnafous (2013) recommande la proportion d'un kilogramme de matériel végétal pour un litre d'hydrolat.

2.2. Activités biologiques

Les études concernant la bioactivité des hydrolats sont peu nombreuses en comparaison de celles réalisées sur les HE. Malgré la ressemblance directe entre les hydrolats et les HE correspondantes d'un point de vue chimique, Carlini *et al.* (1983) ont observé que l'effet psychopharmacologique de l'hydrolat obtenu des graines de *Licaria puchury-major* n'est pas en relation avec le contenu moléculaire de l'HE correspondante.

Souza *et al.* (2007) ont mis en évidence la bioactivité de l'HE et l'HD du bois et des branches de *Aniba duckei* sur les larves de *Artemia franciscana*. L'HE avec une concentration de 2 mg/ml et l'HD à 25% entraînent tous deux une mortalité de 100%. Le linalool présent à 0.09% dans ce dernier, serait d'après les auteurs, responsables de cette activité biologique. La croissance d'*Alternaria mali* et *Botrytis cinerea* est inhibée avec différentes concentrations d'HE et HD de *Satureja hortensis*, plante sauvage de Turquie. Cette étude montre des résultats convaincants avec 10% d'HD sur *B. cinerea* et 15% sur *A. mali* Boyraz & Ozcan (2006). Sagdic et Ozcan (2003) ont mis en évidence l'activité antibactérienne des hydrolats de Pimpinella *anisum, Cuminum cyminum, Satureja hortensis*, *Thymbra spicata* et *Origanum vulgare* sur

Escherichia coli, Staphilococcus aureus et Proteus vulgaris et d'autres bactéries.

3. Huiles essentielles et hydrolats étudiés

Monsieur Abril, membre de la coopérative FARMAVERDE exploite les connaissances scientifiques existantes dans différentes sources bibliographiques pour développer des produits thérapeutiques 100% naturels à base d'huiles essentielles, hydrolats et d'autres types d'extraits de Thym (*Thymus vulgaris*), Romarin (*Rosmarinus officinalis*), Pronto Alivio (*Lippia alba*), Curcuma (*Curcuma longa*) et Souci (*Calendula officinalis*) entre autres espèces végétales, non seulement en tant que principes actifs mais aussi en tant que conservateurs afin d'assurer la stabilité des produits finis.

Dans le cadre de cette thèse, j'ai sélectionné les huiles essentielles et hydrolats du Pronto Alivio, Romarin, Souci et Thym en respectant les critères de sélection présentés ci-après, lesquels ont aussi été considérés au moment d'effectuer la recherche bibliographique. Les chémotypes mis en évidence sont le camphre pour les huiles essentielles de Romarin, le p-cymène et le thymol pour les huiles de Thym et la carvone pour l'huile de Pronto Alivio. Le Souci a été sélectionné pour son utilisation dans les codistillations initialement mais n'a pas été utilisé pour les combinaisons postérieures car nous ne sommes pas parvenus à obtenir l'huile essentielle pure.

3.1. Critères de sélection

Quatre critères ont été considérés pour la sélection initiale des huiles essentielles (HE) et hydrolats (HD) étudiés dans le cadre de ce projet : La biodisponibilité, la sécurité, l'efficacité et le cout.

Biodisponibilité: Compte tenu du fait que cette thèse est orientée sur une recherche finalisée, sa mise en œuvre postérieure requiert que la ressource végétale d'intérêt soit cultivée, et par conséquent, qu'il y ait suffisamment d'informations agronomiques pour son obtention. La sélection de ce critère repose aussi sur le fait que nous ne souhaitons en aucun cas travailler avec des espèces végétales dont la cueillette met en péril la ressource végétale et

n'assure pas la constance du contenu moléculaire du matériel dérivé compte tenu de la variabilité des lieux de récolte. La culture des plantes sélectionnées implique donc qu'il existe un contrôle agronomique écologique constant qui permette finalement de standardiser le contenu chimique des produits finis en termes de concentration en principes actifs. Pour ce faire, il doit donc exister d'ores et déjà une information agronomique suffisamment complète et argumentée scientifiquement. De manière implicite, ce critère permet aussi la génération d'emploi dans le secteur agricole et la promotion de systèmes de polycultures qui permettent grâce aux phénomènes allélopathiques, d'optimiser les mécanismes de défense des plantes face à d'éventuelles maladies fréquentes dans les monocultures.

Sécurité : Ce second critère exige que le contenu phytochimique et les concentrations utilisées pour assurer la conservation antimicrobienne et antioxydante ne présentent aucun risque pour la santé humaine. Cette information bibliographique est fondamentale et doit être étudiée de manière exhaustive d'un point de vue scientifique et clinique. La posologie, les contre-indications et précautions éventuelles seront donc précisées dans la mesure du possible pour chacune des huiles essentielles et hydrolats utilisés. Dans le cas de la sécurité d'usage des hydrolats, si nous n'avons pas accès à une information spécifique, l'étude de leur phytochimie et pharmacognosie respective sera nécessaire afin d'établir une relation avec les huiles essentielles correspondantes et les paramètres de sécurité antérieurement spécifiés. Cette analyse de sécurité prendra en considération les effets suivants ; Mutagénécité, Cancérogénicité et toxicité pour la reproduction.

Pour ce faire, la sécurité des huiles essentielles et/ou hydrolats dans le cadre de leur usage dans des produits finis sera étudiée en prenant en considération les normes de sécurité exposées par l'IFRA et l'AFNOR et les indications données dans la saisine 2008BCT0004 de l'ANSM; « Recommandations relatives à l'évaluation du risque lié à l'utilisation des huiles essentielles dans les produits cosmétiques », adoptée par la Commission de cosmétologie le 14 octobre 2010. Dans le cas des huiles essentielles de plantes communes, cette saisine propose « l'approche fondée sur l'équivalence en substances à une huile essentielle prise comme référence » dans le cas spécifique des produits

cosmétiques réglementés par la régulation CLP dont certaines dispositions concernent spécifiquement l'utilisation des HE dans les produits cosmétiques.

Efficacité: Les huiles essentielles avec lesquelles nous travaillons ont déjà une bioactivité démontrée, cependant ce n'est pas systématiquement le cas des hydrolats. Dans le cadre de la recherche bibliographique présentée ci-après, nous présenterons, pour chaque huile essentielle et hydrolat des espèces végétales sélectionnées, l'information existante concernant l'activité antioxydante d'une part, et d'autre part, bactéricide et fongicide sur les microorganismes avec lesquels nous devrons réaliser les essais de bioactivité selon la Pharmacopée européenne (2002) : *Escherichia coli* (Bactérie - B), *Pseudomonas aeruginosa* (B) y *Staphylococcus aureus* (B), *Candida albicans* (Champignon - C) et *Aspergillus niger* (C).

Coût : Ce critère constitue l'un des principaux défis de ce travail de recherche. Dans le cas de l'huile essentielle de Thym par exemple, bien que cette huile ait une activité antimicrobienne supérieure ou égale à celle des parabènes, son coût ne permet pas son usage en tant qu'ingrédient antimicrobien. Cependant, ce n'est pas le cas de l'hydrolat correspondant, utilisé dans les produits de FARMAVERDE CTA avec d'autres plantes, dont le coût est nettement inférieur compte tenu de son rendement d'obtention, supérieur à celui de l'Huile essentielle. Par conséquent, pour appliquer correctement ce critère, nous prendrons en considération, le coût de la matière première végétale utilisée, son rendement en hydrolat, les concentrations utilisées ainsi que le coût final de cet ingrédient dans le produit fini.

Postérieurement, les éléments suivants seront considérés dépendamment des résultats obtenus;

Interaction moléculaire des combinaisons HE-HE et HE-HD : Après avoir évalué la bioactivité des HDs et HEs seuls, des mélanges entre eux seront réalisés afin de mettre en évidence des interactions moléculaires bénéfiques en terme d'activité biologique.

Polyvalence d'activités: Ce dernier critère fait référence à la possibilité qu'un hydrolat ou une huile essentielle puisse non seulement participer au contrôle antimicrobien et/ou antioxydant, mais aussi à une ou plusieurs activités prophylactiques ou thérapeutiques aux concentrations utilisées. Par

ailleurs, il est important de préciser que l'entreprise FARMAVERDE CTA attache beaucoup d'importance à l'utilisation la plus exhaustive possible du matériel végétal obtenu. C'est le cas par exemple de l'utilisation de la mangue (*Mangifera indica*) dont on utilise non seulement la pulpe mais aussi l'amande et l'écorce du fruit dans certains produits.

3.2. *Calendula officinalis*



Figure 6. Planche botanique de Calendula officinalis (Köhler's Medicinal Plants, 1887)

Dénomination CosIng: « *Calendula officinalis flower* oil»[2]

Description de l'huile essentielle: Huile essentielle obtenue par distillation des fleurs de *Calendula officinalis* L.

CAS#: 70892-20-5 / **EINECS #** : 283-949-5

Autre ingrédient d'intérêt dans le cadre de cette thèse : « Eau de fleur de *Calendula officinalis* »

[2] Le chémotype de l'Huile essentielle n'est pas défini dans les fiches COSING.

Description de l'hydrolat: Eau obtenue suite à la distillation par entrainement à la vapeur des fleurs de *Calendula officinalis* L.

CAS# : 84776-23-8 / **EINECS#** : 283-949-5

Source: CosIng - European Commission Database on with informacion on cosmetic substances and ingredients : http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing.

3.2.1. Phytochimie

Petrovic *et al.* (2010) présentent une analyse comparative des HE obtenus en utilisant l'extraction par fluide supercritique et la distillation par entrainement à la vapeur des tubulaires, fleurs et ligules de *Calendula officinalis*. D'après leurs résultats, ceux sont les ligules les plus riches en huile (0.16%) obtenue par entrainement à la vapeur. Ses principaux composés sont : □-cadinol (11.7-29.1%), □-cadinene (3.2-20.3%), □-cadinene (1.5-11.4%) et cadina-3,9-diene (0.4-11.2%). L'extrait obtenu par extraction de fluide super critique contenait additionnellement □-gurjunene, □-caryophyllene, □-gurjunene, cis-muurola-4(14)-5-diene and □-humulene.

Gazim *et al.* (2008) ont comparé les quantités des différents composés de l'HE de *C. officinalis* en réalisant les procédés d'extraction d'entrainement à la vapeur, extraction par headspace-cold finger (HS-CF) et microextraction headspace en phase solide (HS-SPME) accouplée à GC et MS. Les compositions suivantes sont obtenues respectivement après chacune des extractions; □-cadinène (22.5, 22.1, et 18.4 %) et □amma-cadinène (8.9, 25.4, and 24.9 %) et 20.4 % de alpha-cadinol observé seulement suite à la distillation par entraînement à la vapeur. Dans cette étude, les fleurs sèches contiennent 0.1% d'huile - contre 0.06% dans l'étude de Petrovic *et al.* (2010). Chalchat and Garry (1991) et Marczal *et al.* , (1987) ont aussi analysé la composition de *C. officinalis* et présentent les résultats de composition obtenus. La seconde équipe de chercheurs met en évidence un rendement plus élevé d'HE avec les fleurs jaunes qu'avec les fleurs oranges, néanmoins, la composition est la même dans les deux cas. Okoh *et al.* (2008) reportent un rendement supérieur (0,09%) en HE avec les fleurs fraiches, en comparaison avec les feuilles

fraiches et sèches, de même que la perte de certains composants en séchant les feuilles.

3.2.2. Activité antimicrobienne

Janssen *et al.* (1986) ont évalué l'activité antimicrobienne de l'HE de *Calendula officinalis* avec la méthode de diffusion en trempant les disques dans les différents extraits végétaux (capacité maximale de rétention du disque : 2.5 µl.) sur 4 bactéries; 2 Gram positives : *Bacillus subtilis et Staphylococcus aureus et 2 Gram négatives: Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* et le champignon *Candida albicans*. L'HE de *C. officinalis* était active sur tous les microorganismes exceptés contre *P. aeruginosa*. Cependant, ni le contenu moléculaire ni les chémotypes des différentes HE ne sont présentés dans cette étude. Les terpènes oxygénés seraient responsables de l'activité antimicrobienne de l'HE de *C. officinalis* (Gracza, 1987).

Friedman *et al.* (2002) définissent l'activité bactéricide BA_{50} comme étant le pourcentage de l'échantillon qui provoque la diminution de 50% de la population bactérienne. Les chercheurs ont évalué l'activité de 96 HE entre lesquelles, celle de *Calendula officinalis* contre *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, et *Salmonella enterica*. La seule BA_{50} notoire était de 0.02 contre *C. jejuni*.

L'HE de *Calendula officinalis* entre 2000 et 3000 ppm a une activité fungistatique sur *Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. ochraceus* et *Fusarium moniliforme* (Soliman & Badeaa, 2002).

3.2.3. Activité antioxydante

Plusieurs études ont été réalisées concernant l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo* d'extraits hydro alcooliques de Souci, mais aucun concernant l'huile essentielle ou l'hydrolat dérivé.

3.2.4. Propriétés

La commission européenne pour la Santé et les consommateurs approuve l'usage de l'HE de Souci en cosmétique comme agent masquant, (c'est à dire

une substance qui réduit ou inhibe l'odeur ou le gout d'un produit) parfumant et d'entretien de la peau (CosIng).

Outre ces propriétés, aucune information officielle n'a été mise en évidence pour l'huile essentielle de *C. officinalis* concernant les rubriques suivants : Indications thérapeutiques, Contre-indications, Précautions et effets secondaires et Toxicité.

3.3. *Rosmarinus officinalis*



Figure 7. Planche botanique de Rosmarinus officinalis (Köhler's Medicinal Plants, 1887)

Dénomination CosIng: « *Rosmarinus officinalis* leaf oil »[3]

Description: Huile essentielle obtenue par distillation des sommités fleuries et des feuilles de *Rosmarinus officinalis L.*

CAS#: 84604-14-8 / 8000-25-7 / **EINECS #** : 283-291-9

Autre ingrédient d'intérêt dans le cadre de cette thèse : « Eau de feuille de *Rosmarinus officinalis* »

Dénomination COSING: « ROSMARINUS OFFICINALIS LEAF WATER»

[3] Le chémotype de l'Huile essentielle n'est pas défini dans les fiches COSING.

Description : Eau obtenue suite à la distillation par entrainement à la vapeur des feuilles de *Rosmarinus officinalis.*

CAS# : 84604-14-8 / **EINECS#** : 283-291-9

Source: CosIng - European Commission Database on with informacion on cosmetic substances and ingredients :

http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing

3.3.1. Phytochimie

La norme AFNOR NF T 75-214 impose le « profil chromatographique » de l'huile essentielle de Romarin restreint aux types Maroc et Tunisie d'une part et Type Espagne d'autre part avec les pourcentages minimaux et maximaux suivants des composés majoritaires spécifiés entre parenthèses:

Monoterpènes : camphène (6-12%), □□pinène (9-26%)

Oxydes terpéniques : 1,8-cinéole (16-55%)

Monoterpénones : camphre (5-18,5%).

Rašković *et al.* (2014) dans une étude récente, reportent la composition suivante de l'HE de Romarin étudiée, laquelle respecte la norme précédente: 1,8-cineole (43.77%), camphre (12.53%), and □□pinène (11.51%).

Cependant, Miladi *et al.* (2013), évaluent l'activité biologique d'une HE de Romarin cultivé en Tunisie présentant des pourcentages de composés majoritaires n'entrant pas dans les gammes imposées par l'AFNOR avec 24,1% de 1,8 cinéole et 19,87% de camphre.

L'équipe de Ojeda-Sana (2013) reporte que le composé principal des huiles de Romarin Tunisienne, Turque, marocaine et italienne est le 1,8-cinéol avec un pourcentage relatif supérieur à 40%, alors que la plupart des huiles espagnole, francaise et grecque ont cette molécule, l'α–pinène et le camphre dans des proportions similaires entre 20 et 30%.

3.3.2. Activité antimicrobienne

Les monoterpènes oxygénés tels que le 1,8 cinéol présentent différents degrés de cytotoxicité. Grâce à leurs caractéristique lipophiliques, ils traversent la membrane cytoplasmique de la bactérie en affectant son potentiel par le biais

de la réduction ionique et par conséquent la pompe à proton et l'épuisement de l'ATP (Moon, Wilkinson, & Cavanagh, 2006).

Deux huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis var. troglodytoruma* ayant chacune des pourcentages relatifs élevés de 1,8 – cinéole (29.1 et 26.0%) et de camphre (29.7 et 26.1%) ont toutes deux présenté des activités antimicrobiennes importantes contre *E. coli* ATCC 10536 (15 et 16 mm) et *S. aureus ATCC 6538* (10,5 et 13,5 mm) entre autres bactéries étudiées. Par contre, aucune d'entre elles n'a montré d'activité contre *P. aeruginosa* (Zaouali *et al.* 2010). Dans cette étude, l'efficacité bactéricide de ces deux huiles traduite par la concentration minimale bactéricide (MBC) est de 5 µl/ml contre *E. coli* ATCC 10536 (2,5) et n'a pas été évaluée contre *P. aeruginosa* et *S. aureus.*

Selon Viuda-Martos *et al.* (2008), l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de Romarin est plus importante en utilisant la méthode de diffusion avec disques, laquelle permet de mettre en évidence les diamètres suivants d'inhibition pour *Staphylococcus xylosus* (17,23 mm), *Staphylococcus carnosus* (23,53), *Enterobacter gergoviae* (28,47), *Enterobacter gergoviae* (28,47), *Enterobacter amnigenus* (18, 07), *Lactobacillus sakei* (20,17), *Lactobacillus curvatus* (18,82). L'activité de cette huile essentielle est due à la présence d'□lpha□pinène, du 1,8- cinéol, du camphre et du bornéol (Viuda-Martos *et al.* 2008).

De même, Tavassoli *et al.* , (2011) ont mis en évidence l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Romarin chémotype 1,8 cinéol (1,8 cinéol: 23,14%; camphre: 12,35%; □□pinène: 9,87%; β –pinène: 6,10%, bornéol: 5,61%, camphène : 5,58% et □□terpinéol : 4,30%) contre *Leuconostoc mesenteroides* PTCC1591, *Lactobacillus delbruekii* PTCC1333, *Saccharomyces cerevisiae* PTCC5269 et *Candida krusei* CFC 5295, et ont évalué la MIC (mg/ml) à 6 concentrations différentes (0,125 ; 1,25 ; 1,5 ; 1 ; 1,5 et 2 mg/ml). *L. mesenteroides* et *L. delbruekii* ont présenté une croissance importante aux concentrations 0,125 et 0,25, lente à 0,5 et négative avec 1, 1,5 et 2 mg/ml. Dans le cas de *S. cerevisiae* et *C. krusei*, leur croissance est ralentie à partir de 1,5 mg/ml et inhibée avec 2 mg/ml. De même, les concentrations bactéricides (MBC) confirment les MIC antérieures ; *L.*

mesenteroides : 1,0 ; *L. delbruekii* : 1,5 ; S. cerevisiae : 1,75 et *C. krusei* (*S. orientalis*) :2,0.

Celiktas *et al.* (2007) ont mis en évidence des résultats d'activité antimicrobienne différents selon le moment et le lieu de récolte du Romarin chémotype 1,8 cinéol (Profil obtenu au printemps :1,8 cinéol : 60% ; camphre : 24,1%, verbénone : 45,2 %) contre *Proteus vulgaris* ATCC 6897 (MIC :2,5 et MBC :5 mg/ml), *E. feacalis* ATCC 29212 (MIC et MBC : 2,5 mg/ml) – ces deux bactéries étant les plus sensibles -, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC et MBC : 5 mg/ml), *B. subtilis* ATCC 6633 (MIC : 2,5 et MBC : 5 mg/ml), *C. albicans* ATCC 10239 (MIC : 2,5 et MBC : 5 mg/ml), *Klebsiella pneumoniae* CCM 2318 (MIC et MBC : 10 mg/ml), *E. coli* ATCC 11230 (MIC et MBC : 10 mg/ml), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (MIC et MBC : 10 mg/ml) et *S. aureus* ATCC 6538 (MIC et MBC : 10 mg/ml).

Schelz *et al.* (2006) ont aussi mis en évidence un effet antiplasmidique de l'HE de Romarin, cependant, ils ne présentent pas le contenu moléculaire de l'Huile étudiée, ni ne spécifient son chémotype.

Outre l'activité antimicrobienne du Romarin, Ahmed *et al.* (2011) ont mis en en évidence une activité anti-leishmanienne de l'huile essentielle de Romarin contre *Leishmania major* et *L. infantum* et sa cytotoxicité contre la lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7 ATCC TIB-71 avec une CI50 leishmanicide de 0,43 mg/ml pour *L. major* et 0,25 mg/ml contre *L. infantum.*

L'activité antimicrobienne de *R. officinalis* varie cependant dépendamment de son chémotype. Akrout *et al.* (2010) ont étudié l'activité biologique des trois chémotypes suivants :

Chémotype I : 1,8 – cinéol: de 55,2 à 59,5 ; □□pinène: de 8,9 à 11,5% et camphre : de 9,7 à 11,2%.

Chémotype II; 1,8 – cinéol: de 32,1 à 37,0 ; camphre : de 20,0 à 24,9% ; □□pinène: de 12,2 à 12,7% et camphène : de 11,0 à 12,7%.

Chémotype III; 1,8 – cinéol: de 18,2 à 20,3 ; camphre : de 16,9 à 17,5% ; □□pinène: de 16,5 à 19,0% ; verbénone : de 9,9 à 15,5% et bornéol : de 9,7 à 11,3%.

Le chémotype III est proche de celui des HE que nous avons étudié dans le cadre de cette thèse, bien que notre HE ait un pourcentage de camphre

supérieur (29%). Contre *S. aureus* et *E. coli*, ce dernier chémotype a présenté des diamètres d'inhibition respectifs de 10.3 et 12 mm et des MBC de 5 mg/ml contre *E.coli* et supérieure à 10 mg/ml contre *S. aureus*.

3.3.3. Activité antioxydante

Akrout *et al.* (2010), dont l'étude de l'activité antimicrobienne de trois chémotypes d'HE de Romarin est présentée précédemment, ont aussi évalué l'activité antioxydante des 3 chémotypes d'HE de Romarin – en utilisant la méthode du DPPH. Avec le chémotype III, lequel est semblable au chémotype que nous avons utilisé, excepté son contenu en camphre, les auteurs ont obtenu une CI_{50} de 6.7 µl/ml équivalent à 5963 µg/ml avec une densité de l'HE de 0.89.

La différence des IC_{50} obtenues avec celles obtenues pour l'acide ascorbique peut être attribuée à des facteurs tels que la composition chimique de l'huile essentielle, le protocole expérimental utilisé, la relation entre la quantité d'huile et la quantité de la solution de DPPH dans le mélange utilisé, le temps d'incubation, la manière de présenter les résultats d'CI_{50}, laquelle implique qu'il est difficile de comparer des résultats entre différents articles. Enfin l'activité antioxydante des HE peut être due à un effet synergique entre ses composés principaux et les autres composés donnant lieu à différents résultats.

Les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis var. troglodytoruma* mentionnées précédemment pour leur activité antibactérienne ont aussi une activité antioxydante avec toutes deux, des CI_{50} de 6 µl/ml avec la méthode du DPPH, résultat qui concordent avec ceux obtenus en appliquant la méthode Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) (Zaouali *et al.* , 2010).

Selon Yors *et al.* (2013), la capacité antioxydante de l'extrait acétonique de romarin est supérieure à celle de l'huile essentielle de la même plante laquelle présente un chémotype 1,8 cinéol (1,8 cinéol 35,8%, camphre: 14,5% ; □□pinène : 10,6% et camphène : 4.4 %). Cette différence serait due au contenu phénolique du premier extrait (carnosol, acide rosmarinique, acide carnosique), lequel est en lien avec l'activité antioxydante. Par exemple, avec la méthode du DPPH, l'extrait acétonique présente une CI_{50} de 20,5 µg/ml et

l'HE entre 7,73 et 12,8 mg/ml ce qui démontre que les molécules de cette plante ayant la responsabilité antioxydante la plus importante sont présentes principalement dans l'extrait acétonique.

La réduction du radical DPPH par les HE dépend de leur concentration (Yang *et al.* , 2010). L'HE de Romarin chémotype cinéol (1,8-cinéol : 46,1 % ; □□pinène: 11,63% ; camphre : 9,38 % ; β-terpinène : 7,14%) présente une CI_{50} modérée de 34.1% avec le DPPH et 69,5% avec l'ABTS en comparaison avec le Trolox (94%).

Wang *et al.* (2008) ont comparé l'activité antioxydante sur le radical DPPH avec l'HE de Romarin chémotype 1,8 cinéol (27,23%) (suivi par l' □□pinène (19,43%), camphre (14,26%), camphène (11,52%) et β-pinène (6,71%)) avec celle de 3 de ses principaux constituants : 1,8 cinéol, □□pinène et β-pinène, obtenant respectivement des résultats d'CI_{50} de 62.45%, 42.7%, 45.61% y 46.21% qui mettent en évidence que l'huile essentielle présente la plus forte activité antioxydante suivie par le β-pinène et l'□-pinène. Il est donc difficile d'attribuer l'effet antioxydant à l'un de ses principes actifs puisque d'après ces résultats, c'est un ensemble de molécules qui agit. Mis à part les composés majoritaires il existe aussi des composés minoritaires qui peuvent contribuer significativement à l'activité de l'HE (Wang *et al.*, 2008). Cependant, d'une part, l'origine des composés isolés n'est pas précisée et d'autre part il aurait été intéressant d'évaluer aussi l'activité du camphre, lequel est le troisième composé le plus important dans l'HE étudiée. Selon Rašković *et al.* (2014) les monoterpènes oxygénés et probablement les cétones monoterpenoïdes ayant des propriétés antioxydantes reconnues, seraient les responsables principaux de la capacité antioxydante de l'HE de Romarin.

3.3.4. Propriétés

La Commission E du ministère de la Santé allemand reconnaît l'usage des feuilles et de l'huile essentielle de romarin dans le traitement « des problèmes digestifs (voie orale), ainsi que des douleurs rhumatismales et des problèmes de circulation sanguine périphérique (en application locale).

La Coordination scientifique européenne en phytothérapie (ESCOP) reconnaît l'usage des feuilles de romarin « pour améliorer les fonctions biliaires et

hépatiques et soulager les troubles digestifs (voie orale), pour soulager les douleurs rhumatismales et les problèmes de circulation sanguine périphérique (application locale), et pour traiter les plaies mineures (application locale) ». L'ESCOP déconseille l'usage de l'huile essentielle de romarin par voie orale.

L'Agence européenne du médicament considère comme « traditionnel » l'usage des feuilles et de l'huile essentielle de romarin « par voie orale, dans le traitement des digestions difficiles et des maux de ventre peu intenses » et « en application locale, en traitement complémentaire des douleurs musculaires et articulaires mineures ». L'Agence recommande une durée de traitement maximale de deux semaines (voie orale) ou de quatre semaines (application locale).

Cependant, les trois références officielles précédentes ne donnent pas d'information spécifique en termes de chémotypes et posologie.

Bien que l'information suivante ne provienne pas d'une source officielle, elle souligne les propriétés suivantes de l'HE de *Rosmarinus officinalis* à camphre :

- Action neuromusculaire variable en fonction des doses,
- Décongestionnant veineux,
- Mucolytique,
- Anti-infectieux faible,
- Cholérétique et cholagogue,
- Diurétique,
- Emménagogue (non hormonale),
- Cardiotonique, tonique générale (à faibles doses)
- Relaxante et décontractante musculaire (à doses plus élevées et non toxiques).

Et celles-ci pour l'HE de *Rosmarinus officinalis* L. à cinéol (*cineoliferum*) :

- Anticatarrhale, expectorante (grande valeur thérapeutique), mucolytique,
- Anti-infectieuse variable, bactéricide et fongicide (Franchomme *et al.,* 2001).

La commission européenne pour la Santé et les consommateurs approuve l'usage de l'HE des feuilles de *R. officinalis* en cosmétique comme agent

masquant et agent d'entretien de la peau. En ce qui concerne l'hydrolat, son usage est approuvé simplement en tant qu'agent masquant (CosIng).

3.3.5. Objectivations

Franchomme *et al.* (2001) indiquent que l'huile essentielle *Rosmarinus officinalis camphoriferum* peut être utilisée pour les affections suivantes :

- Contracture musculaire (grande valeur thérapeutique)
- Myalgie (valeur moyenne)
- Crampe (grande valeur thérapeutique)
- Rhumatismes musculaires (valeur moyenne)
- Hypertension en doses faibles),
- Hypotension en doses plus fortes,
- Hypertension cérébrale (valeur moyenne)
- Faiblesse cardiaque (grande valeur thérapeutique)
- Stase circulatoire avec ou sans varices
- Dyspepsies, atonie digestive, chlécystite chronique (valeur moyenne)
- Hépatomégalie, cirrhose, hépatites obstructives, hypercholestérolémie
- Aménorrhée (valeur moyenne), oligoménorrhée (intérêt moins important)

En ce qui concerne l'huile essentielle *Rosmarinus officinalis cineoliferum* les mêmes auteurs spécifient les indications suivantes :

- Otite, sinusite, bronchite, refroidissement pulmonaire
- Sclérose en plaques
- Entérocolite d'origine fermentaire
- Cystites.

En ce qui concerne l'hydrolat de Romarin, celui à camphre n'est pas reporté. Par contre, l'hydrolat à verbénone est considéré comme activateur du métabolisme, énergisant et stimule la fonction rénale, le système cardio-vasculaire, les fonctions hépato biliaires, est expectorant, mucolytique, détoxiquant général et améliore la capacité digestive. En cosmétique il est utilisé pour l'acné, la chute des cheveux, les pellicules et les cheveux gras (Bosson, 2011).

3.3.6. Contre-indications et précautions

L'usage de l'HE de Romarin par voie orale exige des précautions et les recommandations d'usage varient selon les sources :

L'Agence européenne du médicament (EMA) recommande de ne pas dépasser deux gouttes par jour, alors que la Commission E recommande jusqu'à 20 gouttes par jour et que l'ESCOP en déconseille totalement l'usage.

Par ailleurs, il existe trois types d'HE de Romarin selon la substance qui y prédomine : camphre, cinéole ou verbénone. L'huile essentielle riche en verbénone est toxique à faible dose et devrait être évitée.

Selon l'EMA, l'HE de Romarin peut être utilisée dans l'eau d'un bain (de 10 à 27 mg par litre selon l'EMA) ou en massage, diluée à 5 % dans de l'huile d'amande douce.

Enfin, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) déconseille l'usage de l'HE de Romarin (sans préciser de chémotype particulier) en cas d'hypersensibilité ou d'allergie à la plante et pour les patients souffrant d'asthme bronchique et de bronchite. Par ailleurs l'OMS déconseille son usage sur la peau en cas de blessure, de brulures dues au soleil ou d'éruption cutanée.

Selon l'Agence européenne du médicament, il est préférable d'éviter de prendre des produits à base de romarin pendant la grossesse et pendant l'allaitement, hors usage alimentaire. La même agence précise que l'usage des feuilles de romarin séchées doit être réservé aux enfants de plus de douze ans, et celui de l'huile essentielle de romarin aux personnes de plus de dix-huit ans.

Par voie orale, le Romarin est contre-indiqué chez les personnes qui souffrent d'obstruction des voies biliaires (calculs) ou d'une maladie du foie et est également contre-indiqué chez les personnes qui ont développé des signes d'allergie à cette plante.

En usage local, les bains au romarin sont déconseillés aux personnes qui souffrent de plaies étendues, de maladies aiguës de la peau, de fièvre élevée, d'infections sévères, ainsi que de problèmes circulatoires et d'hypertension artérielle.

L'inhalation d'HE de romarin est déconseillée en cas d'asthme, de coqueluche ou de laryngite striduleuse (une infection virale de l'enfant). Celle-ci peut causer l'irritation et occasionnellement des spasmes du larynx. Des troubles

gastro-intestinaux peuvent apparaitre suite à l'ingestion orale de l'HE de Romarin (Blumenthal, 1998). L'usage externe peut empirer un bronchospasme et rarement occasionner une hypersensibilité de la peau. Par ailleurs l'HE peut générer un effet de photosensibilité ou une dermatite allergique (Armisen *et al.* , 2003; Inui and Katayama, 2005) et la chéilite (Guin, 2001).

Compte tenu des risques d'irritation, l'HE de Romarin ne doit pas être utilisée sur le visage ou les muqueuses et le contact avec les yeux doit être évité. Après l'application de l'huile essentielle, se laver les mains pour éviter le contact avec le visage et les yeux. Comme avec toutes les huiles essentielles, la dose prescrite ne doit pas être excédée. Si les symptômes de rhumatisme persistent ou empirent comme par exemple en cas de rougeur, inflammation ou surchauffe des articulations, consulter un médecin (OMS, 2009).

Bien qu'aucune interaction de la drogue n'ait été mise en évidence, le 1,8 cinéol, principal composé de l'huile étudié, est reconnu pour induire les enzymes métaboliques hépatiques. Par conséquent, cette huile essentielle peut interagir avec d'autres médicaments (OMS, 2009).

L'huile essentielle est antimutagène chez les rats traités avec le cyclophosphamide (Fahim *et al.* 1999). .

Compte tenu du manque d'information concernant la sécurité de cette huile, son usage n'est pas conseillé pendant l'allaitement (OMS, 2009).

En ce qui concerne l'usage pédiatrique de cette huile, compte tenu du manque d'information concernant sa sécurité, son usage est déconseillé chez les enfants de moins de 12 ans (OMS, 2009).

D'après Blumenthal (1998), cette HE peut être utilisée par voie orale ou locale et en aromathérapie (Moss *et al.* , 2003; Fernandez *et al.* , 2004). L'HE doit être placée dans un récipient hermétique dans un endroit frais et ventilé à l'abri de la lumière.

Concernant les terpénoïdes, l'ANSM a donné les recommandations suivantes pour les concentrations de camphre, eucalyptol et menthol dans les Cosmétiques. Pour les enfants de moins de 36 mois, 0,015% et pour les cosmétiques pour enfants de 3 à 6 ans : camphre : 0,15 %.

3.3.7. Posologie

Par voie orale: 1 ml d'HE, par voie locale : 6 à 10% d'HE en préparations semi solide et liquides (Blumenthal, 1998). Cependant, aucun chémotype correspondant à cette posologie n'est spécifié.

3.3.8. Toxicité

La OMS signale une étude de l'effet embryotoxique du D-camphre sur des souris et des lapins après l'administration intragastrique pour le traitement de disrégulations hypotonique et circulatoire. Aucun effet tératogène n'a cependant été observé lorsque le D-camphre était administré par voie orale jusqu'à 1 g/kg/jour à des rates gravides pendant la période d'organogenèse. Chez la rate une réduction dose dépendante de l'ingestion d'aliments et de la salivation à des doses à partir de 464 mg/kg. Une dose de 1mg/kg/jour provoque des signes prononcés de toxicité tels que des convulsions cloniques, piloérection, réduction de la motilité et de la masse corporelle. Chez la ratte, l'administration intragastrique d'une forte dose (681 mg/kg/jour) cause la perte de masse corporelle et la consommation d'aliment. Aucune incidence de variations, retard ou malformation n'a été observée chez les « descendants » des animaux aux doses testées, ni même à la plus forte des doses (rat : 1000 mg/kg/jour ; lapin : 681 mg/kg/jour).

La dose maximale de camphre pour un usage thérapeutique humain est d'approximativement de 1.43 mg/kg. Par conséquent, dans les conditions expérimentales présentées, le ratio thérapeutique est au-dessus de 450 pour le point final d'embryotoxicité, ce qui reflète donc une large marge de sécurité (Leuschner, 1997). Considérant que le D-camphre est seulement l'un des constituants de l'huile essentielle, la pertinence de ces données en relation avec la toxicité de l'huile essentielle doit être étudiée.

3.4. *Thymus vulgaris*



Figure 8. Planche botanique de Thymus vulgaris (Köhler's Medicinal Plants, 1887)

Dénomination CosIng: « *Thymus vulgaris* leaf oil »[4]

Description: Huile essentielle obtenue par distillation des feuilles de *Thymus vulgaris* L.

CAS#: 84929-51-1 / **EINECS #** : 284-535-7

Autre ingrédient d'intérêt dans le cadre de cette thèse : Hydrolat de *Thymus vulgaris*.

Dénomination COSING: «THYMUS VULGARIS FLOWER/LEAF/STEM WATER»

Description : Eau obtenue suite à la distillation par entrainement à la vapeur des fleurs, feuilles et tiges de *Thymus vulgaris.*

CAS#: 84929-51-1

EINECS # : 284-535-7

Source: CosIng - European Commission Database on with informacion on cosmetic substances and ingredients : http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing

[4] Le chémotype de l'Huile essentielle n'est pas défini dans les fiches COSING.

Dans le cadre de cette étude, deux races chimiques de chémotype thymol sont distinguées ; l'une présentant une concentration supérieure en Thymol en comparaison avec celle du paracymène, et l'autre présentant une concentration supérieure en paracymène.

Le thym vulgaire (*thymus vulgaris*) présente une homogénéité au niveau spécifique, morphologique et caryosystématique mais devient hétérogène tout spécialement au niveau chémotypique, présentant sept races chimiques différentes (Bonnafous, 2013)

Bien que le chémotype paracymène ne soit pas reconnu en tant que tel dans la liste des 7 chémotypes du Thym, Gayda (2013) le distingue cependant de cette manière dans sa thèse. Cependant les deux auteurs spécifient que la teneur en thymol de ce chémotype est inférieure à 10% à la différence de celui étudié dans le cadre de cette thèse lequel présente respectivement des pourcentages de paracymène et thymol de 37 et 27%.

3.4.1. Phytochimie

Dépendamment des régions et de multiples autres facteurs, la composition chimique de l'HE de Thym est variable. En Roumanie, l'équipe de (Boruga *et al.* 2014) ont étudié une HE de Thym à thymol avec les composés majoritaires suivants : p-cymène (8.41%), γ-terpinène (30.90%) et thymol (47.59%). Faleiro *et al.* , (2003) reportent plusieurs publications concernant la composition chimique de l'HE de *T. vulgaris*. (Rustaiee *et al.* 2013) ont aussi étudié la diversité génétique et le polymorphisme chimique des espèces de ce genre.

3.4.2. Activité antimicrobienne

L'efficacité antibactérienne de l'HE de thym à thymol dépend de sa composition chimique non seulement en thymol, mais aussi en d'autres molécules. Le carvacrol par exemple, de même que le thymol, est capable d'augmenter la perméabilité membranaire facilitant ainsi l'accès des autres métabolites secondaires dans la cellule (Helander *et al.* 1998; Trombetta *et al.* 2005).

Rota *et al.* (2008) ont évalué l'activité antibactérienne de l'HE de *T. vulgaris* chémotype thymol (thymol : 57,7% ; p-cymène : 18,7%) en appliquant la

méthode de diffusion par disque sur 7 bactéries Gram-négative parmi lesquelles *Escherichia coli* serovar O157:H7 CECT 4267, *Escherichia coli* CECT 516, et *Staphylococcus aureus* CECT 239 et ont obtenu les zones d'inhibition suivantes: *E. coli* 4267 (19 mm)*, E. coli* 516 (28 mm) *et S. aureus* (45mm). L'activité fongicide de cinq chémotypes d'HE de *Thymus vulgaris* sur *Candida albicans* a été évaluée par Giordani *et al.* (2004). Les résultats de Concentration Minimum Inhibitrice de 80% de la population bactérienne CMI_{80} de cinq chémotypes mettent en évidence une variabilité importante d'un chémotype à l'autre (Tableau 3).

Tableau 3. MIC_{80} de différents HE issues de plusieurs Chémotypes de T. vulgaris et d'amphotéricine B Giordani et al. (2004).

Substance	**MIC 80%**
Amphotericin B	0,672 µg/ml
Tv (0,2 µl/ml) & Amphotericin B	0,348 µg/ml
Tv CH Thymol	0,016 µl/ml
Tv CH Borneol	1,937 µl/ml
Tv CH Geraniol	3,352 µl/ml
Tv CH Linalool	4,579 µl/ml
Tv CH Thuyanol-4/terpineol-4	5,915 µl/ml

L'HE de Thym à thymol est de loin la plus active contre *C. albicans*. Giordani *et al.* (2004) classifient les différentes HE testées en 3 catégories dépendamment de ces résultats de MIC ; < 1 µl/ml : forte propriété antifongique ; entre 1 et 3 µl/ml: moyenne ; supérieur à 3 µl/ml : faible et de 3,1 à 6 µl/ml : très faible. Les résultats obtenus avec l'HE de Thym CH thymol corroborent ceux obtenus précédemment concernant la forte activité antibactérienne du thymol.

Un effet de potentialisation de l'activité de l'amphotéricine B est observé lorsque l'HE de *T. vulgaris* CH thymol est ajoutée à raison de 0.2 µl/ml permettant l'obtention d'une MIC équivalent approximativement à 50% de celle obtenue avec l'amphotéricine B seule. La présence de faibles concentrations de l'HE de *T. vulgaris* augmente de manière surprenante la MIC_{80} de l'amphotéricine B (entre 0.00031 et 0.1 µl/ml) démontrant un effet antagonique entre les deux substances de même qu'entre l'amphotéricine B

mélangée avec l'imidazole (Dupont et Drouhet, 1979 in Giordani *et al.* 2004) ou le micronazole (Siau et Kerridge, 1998 in Giordani *et al.*, 2004).

Selon Giordani *et al.* (2008) le potentiel antifongique d'une HE de *T. vulgaris* CH Thymol (Thymol: 25%; p-Cymène: 26% et □□pinène: 12%) contre *C. albicans* ATCC 90029 atteint une MIC_{80} de 3.7 µg/ml.

Sacchetti *et al.* (2005) mettent en évidence le potentiel antimicrobien et antioxydant élevé de l'huile essentielle de *T. vulgaris* à Thymol en comparaison avec 11 huiles essentielles (*Cananga odorata*, *Cupressus sempervirens*, *Curcuma longa, Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus globulus*, *Pinus radiata, Piper crassinervium, Guayaba psidium, Rosmarinus officinalis*, *Thymus citriodora* et *Zingiber officinale*). Les auteurs ajoutent que cette huile peut être utilisée comme patron compte tenu de sa forte activité antimicrobienne et antioxydante. Les autres huiles essentielles testées démontrent des résultats de 5 à 10 fois supérieures à ceux obtenus avec l'HE de *T. vulgaris* à Thymol pour qui la MIC contre *C. albicans, Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae* est de 0.06 mg/ml. L'activité antiradicalaire sur DPPH des 12 HE étudiées mesurée par Sacchetti *et al.* Met aussi en évidence une activité importante de l'HE de T. vulgaris à thymol supérieure à celle du Trolox. Faleiro *et al.* (2003) reportent d'autres publications concernant l'activité antimicrobienne de l'HE de *T. vulgaris*. Kaloustian *et al.* (2008) ont évalué l'activité antimicrobienne d'une HE de *T. vulgaris* et de certains de ses composés principaux; Thymol et Carvacrol en appliquant la méthode de dilution (Tableau 4).

Tableau 4. MIC des HE et molécules principales de différentes bactéries selon Kaloustian et al. (2008)

Huile essentielle ou Molécule	**Bactérie**	**MIC**
Tv CH Carvacrol	*Escherichia coli (G-)*	1000 µg/ml
Thymol	*Escherichia coli (G-)*	200 µg/ml
Thymol	*Staphylococcus aureus (G+)*	200 µg/ml
Tv CH Carvacrol	*Staphylococcus aureus (G+)*	2000 µg/ml
Carvacrol	*Escherichia coli (G-)*	400 µg/ml
Carvacrol	*Staphylococcus aureus (G+)*	400 µg/ml

Contrairement aux observations antérieures concernant l'effet synergique des différents composés de l'HE et celui des composés isolés, ces résultats confirment l'importance antibactérienne du thymol et du carvacrol en comparaison avec l'HE de *T. vulgaris* à Carvacrol pour inhiber *E. coli* et *S. aureus.* L'encombrement stérique au niveau de la membrane sera aussi variable dépendamment du fait que l'on utilise une molécule isolée ou une HE. Les molécules ont des stéréochimies différentes dans les deux cas.

Par ailleurs, Sagdic and Ozcan (2003) en appliquant la méthode de diffusion par disque, observent que l'HE de *T. vulgaris* à une concentration de 0,4% a une forte activité contre E. coli O157:H7.

Kumar *et al.* (2008) concluent que l'HE de *T. vulgaris* pourrait être recommandée pour des applications à grande échelle comme une source de conservateurs pour conserver les aliments compte tenu de son efficacité antifongique, antiaflatoxigénique et son large spectre antimicrobien plus efficace que celui de conservateurs synthétiques et exempt de toxicité. Par conséquent, cette HE pourrait être formulée en tant que conservateur sûr et économique d'origine végétal contre les infestations fongiques et la contamination par L'aflatoxine des aliments.

Tout récemment, Miladi *et al.* (2013) ont évalué les activités antimicrobienne, antioxydante et de cytotoxicité *in vitro* contre les adénocarcinomes épithéliaux du poumon humain des HE de *T. vulgaris* à Thymol (41,33%) et de *R. officinalis* à 1,8-cinéol (24,10%) et ont défini les résultats des zones d'inhibition, CIM et CBM (Concentration Bactéricide Minimum) des deux HE (Tableau 5). L'action antimicrobienne des composants des HE croit de la manière suivante ; phénols>aldéhydes>cétones > alcools > éthers >hydrocarbones (Nowak *et al.* , 2012). Le thymol est un phénol et le 1,8 cinéol est un éther, par conséquent la différence entre l'activité des deux HE est importante. Miladi *et al.* (2013) confirment cette observation en reportant les résultats de CMI des mêmes auteurs lesquels sont 10 fois inférieurs pour *T. vulgaris* que pour *R. officinalis* contre *Brochothrix thermosphacta.* Les résultats d'activité antimicrobienne obtenus pour l'HE de *R. officinalis* peuvent aussi être expliqués compte tenu de son fort contenu en 1,8-cinéol, composant ayant une forte activité antimicrobienne (Rosato *et al.* , 2007).

Jouki *et al.* (2014) ont évalué l'activité antioxydante et antibactérienne de pellicules de mucilage de graines de coings imbibées d'huiles essentielles de *Thymus vulgaris* chémotypée thymol (Thymol: 46,42%; p-cymène: 22,31%) de 0 à 2% de concentration. L'activité antimicrobienne a été évaluée sur les lignées suivantes: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (PTCC1154), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *E. coli* O157:H7 (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 1915), *Vibrio cholera* (ATCC 14033) et *Shewanella putrefaciens* (CECT 5346). A partir de 1% de concentration d'HE, les disques élaborés avec la pellicule de mucilage de graines de coings présentaient des diamètres d'inhibition compris entre 50 et 90 mm^2.

Tableau 5. Activité antimicrobienne des HE de T. vulgaris et R. officinalis L. contre les bactéries pathogènes humaines en utilisant la méthode de diffusion et détermination des valeurs de CIM et MBC (mg/mL) (Miladi et al. , 2013)

Microorganismos	**Cepa**	**Inhibición (mm)**	**CIM**	**CBM**
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	28	1.56	3.12
Staphylococcus epidermidis	CIP 106510	26	0.78	1.56
Micrococcus luteus	NCIMB 8166	50	1.56	1.56
Bacillus cereus	ATCC 11778	28	1.56	3.12
B. cereus	ATCC 14579	28	1.56	1.56
Listeria monocytogenes	ATCC 19115	41	1.56	1.56
Escherichia coli	ATCC 35218	29	1.56	1.56
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	32	3.12	3.12
Enterococcus feacalis	ATCC 29212	27	1.56	3.12
Vibrio alginolyticus	ATCC 17749	30	3.12	3.12
Vibrio alginolyticus	ATCC 33787	32	3.12	3.12
Salmonella typhimurium	ATCC 1408	24	1.56	3.12
Salmonella typhimurium	LT2 DT104	20	1.56	1.56
S. entiriditis (1127)	Manipulator (06-09-2000)	30	1.56	3.12
S. entiriditis (1128)	Manipulator (06-09-2000)	45	1.56	1.56
S. entiriditis (1129)	Manipulator (05-09-2000)	24	1.56	1.56
S. entiriditis (1130)	Patient (06-09-2000)	22	1.56	3.12
S. entiriditis (1131)	Manipulator (05-09-2000)	19	1.56	1.56
S. entiriditis (1133)	Patient (06-09-2000)	35	1.56	1.56

3.4.3. Activité antioxydante

Les biphényls, dimères du thymol et les flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* ont une activité antioxydante aussi forte que celle du hydroxytoluène butylé (BHT), puissant antioxydant synthétique. Dépendamment de leur composition chimique, les HE de *Thymus vulgaris* peuvent aussi présenter une activité antioxydante intéressante.

Jouki *et al.* (2014) ont évalué l'activité antioxydante et antibactérienne de pellicules de mucilage de graines de coings imbibées d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* chémotypée thymol (Thymol: 46,42%; p-cymène: 22,31%). L'équipe de chercheurs a obtenu une IC_{50} de 18.39 µl/ml avec le DPPH.

Dans leur étude comparative avec 11 autres HE présentées dans le sous chapitre antérieur, Sacchetti *et al.* (2005) évaluent aussi l'activité antioxydante en utilisant le DPPH, la méthode de décoloration du β-carotène et l'essai luminol-photochemiluminescence (PCL), lequel permet la première et seconde étape d'oxydation (Mantle *et al.* , 1998) et la capacité et le pouvoir antioxydant liposoluble de se poursuivre, permettant l'observation d'oxydation primaire et secondaire du radical et la capacité de capturer des lipides. L'HE de *Curcuma longa* présente une capacité de captation légèrement inférieure à celle de l'HE de *T. vulgaris* laquelle présente un pourcentage d'inhibition de 75,6 ± 0,53%. En ce qui concerne l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique avec la méthode de décoloration du β-carotène, les résultats obtenus avec l'HE de T. vulgaris (90,9 ± 0,64 %) étaient supérieurs à ceux obtenus avec l'hydroxyanisole butylé (BHA) (86,74 ± 0,61 %). Par ailleurs, l'HE de *T. vulgaris* était le plus efficace avec la méthode PCL (342 ± 21,8 Trolox mmol/l) en comparaison avec les 11 autres huiles.

Les résultats d'activité antioxydante obtenus par Miladi *et al.* (2013) avec les HE de *T. vulgaris* à Thymol (41,33%) et de *R. officinalis* à 1.8-cinéol (24,10%) confirme l'effet dose dépendant pour les deux HE avec des IC50 de captation du radical DPPH respectives de 437 et 189 µg/ml. Cependant, il est important de préciser que pour l'évaluation de cette activité, Miladi *et al.* (2013) ont utilisé des proportions importantes d'HE et de DPPH; respectivement 1 ml et 0,25 ml.

Ces différents résultats d'activité antioxydante et antimicrobienne des HE de *T. vulgaris* CH Thymol et de *R. officinalis* CH 1,8-cinéol, permettent ainsi de confirmer l'intérêt que reçoivent ces huiles extraites d'épices condimentaires ou les molécules qui les composent, non seulement pour l'industrie alimentaire mais aussi d'autres industries telles que la phytopharmaceutique à la recherche d'alternatives aux substances conservatrices synthétiques.

3.4.4. Propriétés

Selon (Bonnafous, 2013), toutes les HE de Thym ont des propriétés antibactériennes et antifongiques. L'HE ayant une concentration élevée en paracymène a aussi une activité antalgique notoire

La commission européenne pour la Santé et les consommateurs approuvent l'usage de l'HE des feuilles de *T. vulgaris* en cosmétique comme agent antimicrobien, antioxydant et conservateur et celui de l'hydrolat pour l'entretien de la peau. Cependant, cette commission ne donne aucune information spécifique concernant le chémotype et/ou la composition chimique des HE mentionnées.

Le thymol et carvacrol contenus dans l'huile essentielle et dans l'hydrolat, sont responsables de l'activité antitussive et spasmolytique du thym.

3.4.5. Objectivations

Outre ses activités antimicrobiennes, l'huile essentielle de Thym à thymol est aussi considérée stimulante pour le système nerveux et pour le système immunitaire. Ainsi, en aromathérapie, on indiquera cette huile ainsi que les autres huiles essentielles de Thym pour stimuler la mémoire et la concentration, en cas de fatigue générale, dépression, infections urinaires, intestinales et respiratoires (Bonnafous, 2013).

En ce qui concerne l'huile essentielle de Thym ayant un concentration élevée de p-cymène, elle est indiquée par Franchomme *et al.* (2001) pour les rhumatismes et les arthroses avec une grande valeur thérapeutique.

L'Agence Européenne du Médicament (EMA) reporte l'usage de l'HE de Thym pour le traitement de la sinusite en bain pour les enfants qui souffrent de cette affection de manière chronique ou aigue, usage référencé par l'essai clinique mené par Busch-Petersen & Hein en 1975.

L'organisation mondiale de la santé reporte qu'une évidence expérimentale (Gordonoff *et al.*, 1931) suggère que l'HE de Thym a une activité sécrétomotrice laquelle est confortée par celle de Freytag *et al.* (1933) qui ont mis en évidence la stimulation des mouvements ciliaires dans la muqueuse du pharynx de grenouilles traitées par des solutions d'HE de Thym, de thymol et carvacrol (OMS, 1999). Cependant, ces applications de l'HE ne sont pas approuvées par l'EMA. Concernant l'usage spasmolytique de l'HE, la monographie de Thym de Natural Standard (www.naturalstandard.com) reporte le travail de l'équipe d'Engelbertz (2008) qui ont démontré que le thymol ne contribuait pas à cette propriété de l'HE. En 2012, Engelbertz *et al.* démontrent que les extraits de Thym ont une activité antispasmodique due aux effets synergiques des composés de l'HE et de la lutéoline laquelle joue un rôle important additionnel à celui des phénols compris dans cette HE.

Les monoterpènes et sesquiterpènes "neutres" tels que le p-cymène, sont considérés comme anti-inflammatoires généraux et présentent un effet de relaxation des muscles lisses (communication personnelle de Catherine Bonnafous).

De même que dans le cas de *Rosmarinus officinalis*, il est frustrant d'observer pour l'HE de *Thymus vulgaris* une longue liste d'indications médicinales traditionnelles et finalement très peu d'indications officiellement démontrées faute d'études suffisantes sur ce type d'extrait, réduisant ainsi le champ d'applications médicinales de ces huile utilisées depuis des centaines d'années.

L'hydrolat à thymol présente des propriétés analgésique, antiseptique, bactéricide, fongicide et virucide et est indiqué en tant que détoxiquant général (Bosson, 2011).

3.4.6. Contre-indications et précautions

L'usage externe de l'HE de Thym à Thymol pur est déconseillé en raison d'un effet dermocaustique. De même son usage oral doit être contrôlé en raison de son potentiel neurotoxique du à son contenu phénolique.

L'Organisation Mondiale de la Santé recommande de ne pas utiliser de produits à base de Thym pendant la grossesse et l'allaitement (OMS, 1999) et conseille aux personnes ayant démontré une sensibilité à des plantes de la famille des Lamiaceae de consulter leur médecin avant d'utiliser un produit à base de Thym.

3.4.7. Toxicité

L'HE de T. vulgaris n'a montré aucune activité mutagène lors des essais réalisés avec *Bacillus subtilis* ou *Salmonella* (OMS, 1999).

3.5. *Lippia alba*



Figure 9. Planche botanique de Lantana mollissima (synonime de Lippia alba) Herbier général de l'amateur, vol. 8 (1817-1827) [P. Bessa].

3.5.1. Phytochimie

Dénomination CosIng: «*Lippia alba* leaf/stem oil»[5]

Description: Huile essentielle obtenue par distillation des feuilles et tiges de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown.

CAS#: 8024-12-2 / **EINECS #**: NS

L'hydrolat n'est pas mentionné dans la commission européenne.

Contrairement à *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis*, il n'existe pas d'information officielle en Europe concernant les différents chémotypes d'HE de *Lippia alba.* Dans un rapport concernant la normalisation des produits naturels obtenus à partir d'espèces de la flore aromatique latinoaméricaine (Dellacassa, 2010), Ciccio et Ocampo précisent que compte tenu de l'existence de tant de biotypes – lesquels sont reportés par les auteurs dans différentes zones biogéographiques d'Amérique - il est difficile d'établir une normativité concernant l'HE de cette plante. En 2005, la UNCTAD (UNCTAD, 2005) présente une étude de marché international du chémotype carvone de cette huile. La liste ci-après présente les molécules majoritaires détectées par Stashenko *et al.* (2004) dans l'HE obtenue par hydrodistillation.

Monoterpènes: limonène (32%), β-cubébène (0,59%) β-myrcène (0,4%), Germacrène A (0,4%), β-Bourbonène

Sesquiterpènes: β-caryophyllène (0,2%), Bicyclosesquiphellandrène (7,3%)

Monoterpénols: cubebol (0,2%)

Oxydes terpéniques: oxyde de pinène (0.37%)

Monoterpénones : carvone (51%), pipériténone (1,47%), pipéritone (0.94%)

L'équipe de Stashenko a étudié la diversité phytochimique d'échantillons de *Lippia alba* obtenus dans différentes régions colombiennes. Cette étude met clairement en évidence trois chémotypes : un premier riche en carvone (41%) et limonène (36%), un second riche en citral (54%) mais aussi en néral et géranial et le dernier, riche en carvone (25%), limonène (22%) et citral (21%). L'état phénologique des plantes n'est cependant pas précisé dans cette étude (Stashenko in Dellacassa 2010). Par ailleurs, la Figure 10 présente

[5] Le chémotype de la plante n'est pas défini dans les fiches COSING.

l'importance de la diversité moléculaire de cette huile en Amérique reportée par Ciccio et Ocampo (in Dellacassa 2010).

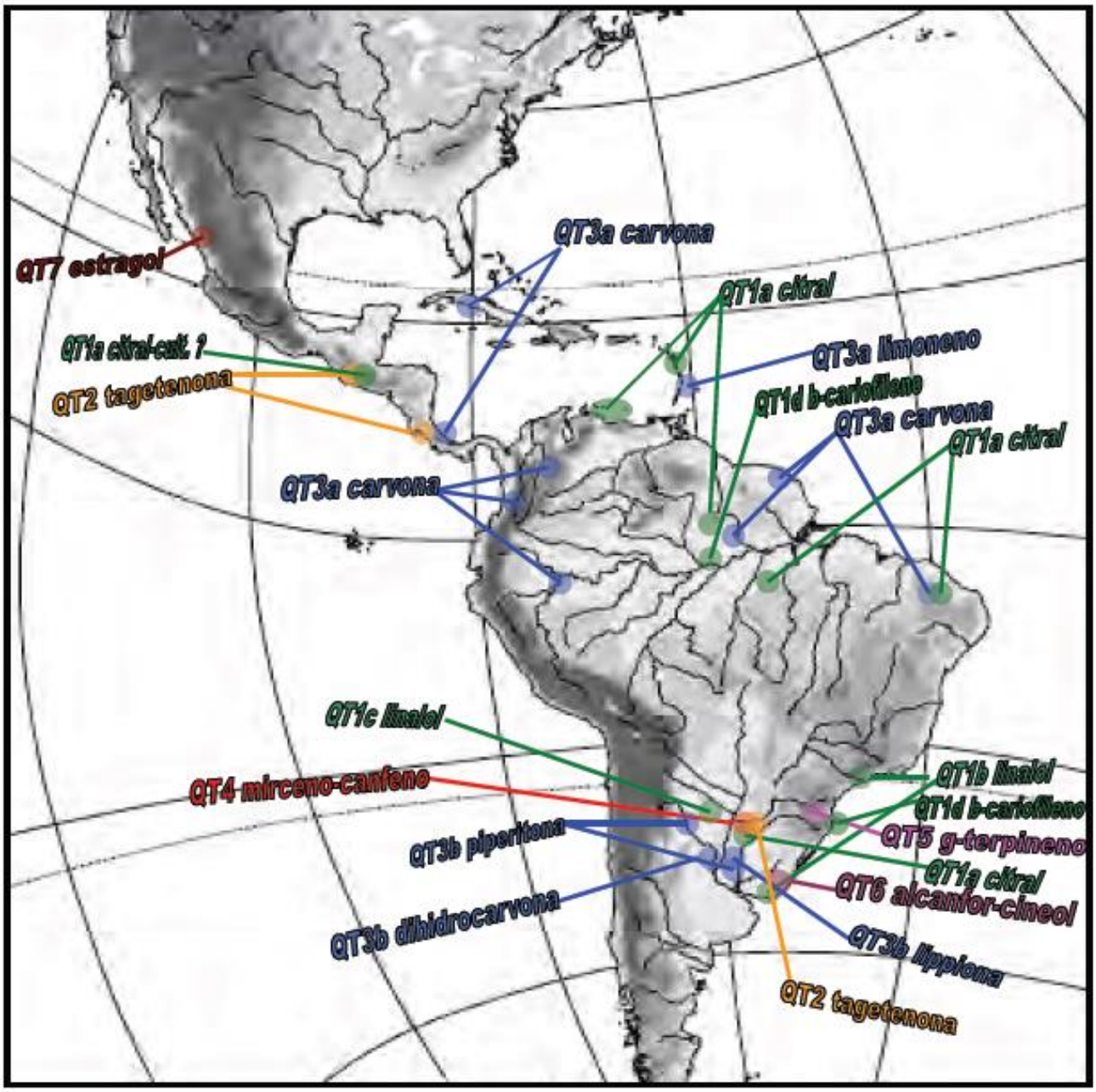


Figure 10. Distribution des chémotypes de Lippia alba en Amérique.

3.5.2. Activité antimicrobienne

Deux HE de L. alba ayant des chémotypes carvone, la première avec 26,2% et 32% de limonène et la seconde respectivement 28,6% et 38,1% ont présenté des Concentrations Minimum Inhibitrices de 125 µg/ml et 157,49 µg/ml contre *Trichophyton rubrum* ATCC28188 d'une part, et d'autre part, 198,43 et 250

µg/ml sur *Trichophyton mentagrophytes* ATCC24198 (Tangarife-Castaño *et al.* , 2012). Ces deux souches de champignon sont responsables de l'onychomycose chez l'homme.

Alea *et al.* (1996) ont testé différentes concentrations d'HE de *L. alba*, chémotype carvone (40%, suivie par le β-guaiène (9.84%) et pipériténone (8.26%) avec la méthode de dilution sur *E. coli,* et *S. aureus* et ont obtenu des CMB respectives de 2.5 et 0.63 mg/ml.

Duarte *et al.* (2005) ont obtenu une activité fongicide de 0.6 mg/ml sur *Candida albicans* avec l'HE de *L. alba* à Linalool (76.3%).

Veras *et al.* (2011) ont analysé une HE de L. alba et évalué son interaction sur les aminoglycosides de différentes souches de *Staphylococcus aureus*, avec un chémotype Géranial et Néral.

3.5.3. Activité antioxydante

Stashenko *et al.* (2004) ont observé une activité antioxydante de l'HE de *L. alba* à carvone (suivie du limonène) entre 5 et 20 g/l en utilisant la méthode de protection de l'oxydation de l'acide linoléique, résultats supérieurs ou similaires à ceux obtenus avec la vitamine E ou l'hydroxyanisole butylé (BHA), lesquels sont couramment utilisés en tant qu'additifs naturels ou synthétiques.

3.5.4. Propriétés

Le Guide phytothérapeutique cubain approuve les actions pharmacologiques analgésique, antifongique et antibactérienne de *L. alba* (Melgarejo *et al.* , 2004). En médecine traditionnelle, les feuilles et fleurs sont utilisées en infusion pour soigner les désordres gastrointestinaux ou digestifs ; spasmes, coliques hépatiques et comme expectorant, fébrifuge et sudorifique. Par ailleurs, des activités antiseptiques, astringents et emménagogues sont attribuées à la plante (Armando, 1996; Gupta, 1995; Morton, 1981). Il existe d'autres activités reportées dans la littérature, cependant aucune information n'est précisée concernant le chémotype de la plante ou son origine géographique (Ciccio & Ocampo in Dellacassa, 2010)

Les résultats obtenus in vitro par Brown *et al.* (1999) suggèrent un effet anxiolytique de l'HE de *L. alba* à carvone et limonène ainsi que des deux autres chémotypes testés (Citral, β-myrcène et limonène d'une part et citral et limonène d'autre part. Gurgel do Vale *et al.* (2002), démontrent que le citral, le myrcène et le limonène ont un effet sédatif et relaxant à forte dose (200 mg/kg) et potentialisent le sommeil induit par le pentobarbital. Cependant, aucune de ces trois molécules n'a d'effet anxiolytique, par conséquent d'autres molécules seraient impliquées dans cet effet dans les différents chémotypes étudiés par Brown *et al.* (1999).

3.5.5. Indications thérapeutiques

Le vadémécum colombien reconnait l'usage anxiolytique et sédatif de l'infusion et décoction de *Lippia alba* par voie orale et en tant qu'antiseptique par voie locale en décoction. Cependant, cet ouvrage n'indique aucune préparation pharmaceutique.

(Blanco *et al.* 2013)

3.5.6. Contre-indications

Le vadémécum colombien précise qu'il n'existe aucune contre-indication à l'usage externe de cette plante, et ne fait aucun commentaire concernant son usage par voie orale.

3.5.7. Précautions et effets secondaires

Aucune précaution particulière rencontrée dans la bibliographie étudiée.

3.5.8. Toxicité

Aucune information rencontrée concernant la toxicité de l'HE de *L. alba* dans la bibliographie étudiée.

4. Méthodes d'analyse chimique des huiles essentielles et hydrolats

La chromatographie en phase gazeuse équipée d'un spectromètre de masse est l'outil de référence pour séparer et caractériser les constituants volatils d'une huile essentielle (Kaloustian *et al.* , 2008).

Outre la caractérisation physico-chimique des constantes propres aux HE (densité, solubilité dans l'alcool, points de fusion, d'ébullition et de congélation, pouvoir rotatoire et indice de réfraction), les fiches techniques industrielles doivent inclure leur chromatogramme et la table de composition chimique laquelle définit les noms des molécules, leur temps de rétention et leurs quantités relatives. Compte tenu de la diversité et complexité moléculaire des HE ; de 50 à 300 molécules différentes présentant différents groupes fonctionnels (alcool, cétones, aldéhydes, lactones, éthers, esters etc.), sont présentes dans l'huile en proportion qui peuvent varier depuis la partie par million (ppm) jusqu'à partie par trillion (E. Stashenko, 2009).

En raison des caractéristiques volatiles de leurs composés (monoterpénoïdes, esters etc.) ou semi volatile (sesquiterpénoïdes, dérivés phénoliques etc.), et de leurs masses moléculaires et points d'ébullition qui n'excèdent pas les 300 u.m.a. et 250°C respectivement, la méthode d'analyse la plus utilisée pour analyser les HE est la chromatographie en phase gazeuse. Le chromatographe de cette technique est composé de quatre unités principales ; (1) l'injecteur qui constitue le système d'application de l'échantillon, (2) la colonne située dans un four de température programmable, laquelle constitue un système de séparation du mélange moléculaire contenu dans l'échantillon, (3) le détecteur, qui identifie les analytes élués dans la colonne et (4) le système de traitement des données. Additionnellement, le chromatographe pourra être accouplé a des dispositifs externes tels qu'un échantillonneur de tête (headspace sampler), un pyroliseur, un équipement de purge et piégeage ou de désorption thermique entre autres.

L'injecteur split/splitless permet d'établir un degré de division de l'échantillon au moment de son injection et participe par conséquent à la sensibilité de l'analyse chromatographique en termes de diversité moléculaire mise en évidence.

La colonne est composée d'une phase stationnaire constituée par un liquide adsorbant fixé sur un solide inerte et d'une phase mobile gazeuse (hydrogène, Hélium ou Azote) qui permettent de séparer les analytes dépendamment de leurs constantes de distribution ou coefficient de partage K entre les deux phases, constante égale à la masse du constituant X par unité de volume de phase stationnaire divisé par la masse du constituant X par unité de volume de phase mobile. Ce coefficient conditionnera alors la durée du parcours du constituant dans la colonne ou temps de rétention. Le choix de la colonne se fait dépendamment de l'extrait à analyser. Dans le cas d'une HE, on préfèrera une colonne longue de 50 à 60 mètres considérant non seulement la complexité moléculaire mais aussi la variation isomérique qui requièrent une haute résolution. La polarité des molécules volatiles impliquera aussi le choix de colonnes préférentiellement apolaires de poly(diméthylsiloxane) DB-1, HP-1, Ultra 1), apolaires avec une phase stationnaire polarisable, 5%-phényl-poly(méthylsiloxane) (DB-5, HP5, Ultra2) et très polaires de poly(éthylène glycol) (DB-WAX ou INNOWAX). L'usage de deux colonnes de polarité différentes est recommandé pour affiner la caractérisation moléculaire. Par exemple dans une colonne apolaire, plusieurs analytes pourront coéluer, alors que dans une colonne polaire, il sera possible de les séparer. Par ailleurs, les conditions opérationnelles de la colonne ; température, vitesse de la phase mobile, polarité, pression etc. permettront d'optimiser la séparation des analytes (E. Stashenko, 2009).

Avec une colonne ayant une phase stationnaire apolaire, l'élution des substances débute avec les hydrocarbures monoterpéniques (de poids moléculaire PM 136) et leurs dérivés oxygénés ; alcools, cétones et acétates (PM 150, 152, 154, 196) jusqu'aux hydrocarbures sesquiterpéniques (PM 204) (E. Stashenko, 2009).

Il existe différents types de détecteur dépendamment des molécules que l'on souhaite mettre en évidence, par exemple : détecteur à ionisation de flamme (FID), d'azote et phosphore (NPD), de conductivité thermique (TCD), de capture d'électrons (ECD), le détecteur sélectif de masse (MSD) ou spectromètre de masse (MS).

Pour l'analyse des HE, les détecteurs FID et le MS sont principalement utilisés. Le premier permettra la quantification des composants de l'huile et le second de complémenter la quantification du détecteur FID en apportant les spectres de masse de chaque composé qui permettra son identification (E. Stashenko, 2009).

Les techniques d'headspace et de micro-extraction en phase solide utilisées ensemble, augmentent la concentration de l'échantillon. La première s'adapte à la qualité volatile de l'analyte lequel se trouve dans une matrice que l'on ne peut analyser directement par chromatographie. Le prélèvement se fait dans l'espace de tête au-dessus de la solution par micro-extraction avec une fibre en silice fondue, placée à l'intérieur d'une aiguille creuse rétractable. Cette fibre est recouverte d'une phase stationnaire laquelle est sélectionnée pour son affinité aux analytes que l'on souhaite extraire. Les analytes sont ensuite désorbés par un flash thermique lorsque la fibre est placée à l'intérieur de l'injecteur du chromatographe (Papet *et al.* , 2010). Ces deux techniques ont été utilisées pour l'analyse des composés volatils des hydrolats étudiés.

5. Méthodes d'analyse de l'activité antioxydante

5.1. Caractérisation du mécanisme antioxydant

Un antioxydant est une molécule capable d'inhiber l'oxydation. La capacité antioxydante est liée à la capacité d'une substance de protéger un système biologique contre les effets nocifs de réactions qui impliquent des molécules oxygénées et azotées (ROS et RNS) (Karadag *et al.* , 2009). L'oxygène, bien qu'étant le premier élément essentiel pour la vie, est aussi responsable de processus d'oxydation qui impliquent un stress oxydatif (García-Plazaola et Becerril, 1999), détérioration de la qualité des aliments (Finley & Otterburn, 1993) ainsi que le désordre de la santé humaine liée à l'oxydation de molécules biologiques (Bermond, 1990; Ramarathnam & Osawa, 1994) et lorsque l'oxygène se transforme en des formes plus réactives telles que le superoxyde, peroxyde d'hydrogène, oxygène singlet et radicaux hydroxyles connus en tant qu'oxygène actif qui se forme dans les cellules par différentes voies métaboliques et pouvant causer de sérieux endommagements au niveau

des protéines et de l'ADN. Au niveau médical, les radicaux libres oxygénés sont aussi des causes importantes d'inflammation en lien avec des maladies comme l'arthrite rhumatoïde et peuvent stimuler la croissance de cellules malignes de mammifères (K. Svoboda & Hampson, 1999).

Les antioxydants peuvent désactiver les radicaux selon deux mécanismes principaux ; Le transfert d'atome d'hydrogène (HAT) et le transfert d'électron unique (Single Electron Transfer – SET). Indépendamment du mécanisme, le résultat final est le même, mais les cinétiques de réaction et leurs effets collatéraux diffèrent. Les deux types de mécanismes peuvent se produire parallèlement et le mécanisme dominant dans un système donné, sera déterminé par la structure de l'antioxydant et par ses propriétés de solubilité et coefficient de partition. L'énergie de dissociation de la liaison (Bond Dissociation Energy – BDE) et le potentiel d'ionisation (IP) sont les deux facteurs principaux qui détermineront le mécanisme et l'efficacité des antioxydants (Wright *et al.* , 2001). Par conséquent il est important de considérer un protocole expérimental qui implique plus d'une propriété ou mécanisme antioxydant. Les composés polyphénoliques par exemple ont plusieurs activités et l'activité dominante dépend du milieu et du substrat utilisé (Prior *et al.* , 2005). Ainsi, les caroténoïdes ne sont pas particulièrement des bons extincteurs « quenchers » de radicaux péroxyl en comparaison des composés phénoliques, par contre ce sont d'excellents captureurs d'oxygène singulet.

Les méthodes qui mettent en évidence le mécanisme HAT – telles que ORAC ; « Oxygen Radical Absorbance Capacity » et TRAP ; « Total Radical-trapping antioxidant parameter » mesurent la capacité de l'antioxydant d' « éteindre » le radical par le biais de la donation d'un atome d'hydrogène selon la réaction : X*+AH -> XH+A*. La réactivité relative des méthodes basée sur ce mécanisme HAT est basée sur la BDE du groupe donateur de proton de l'antioxydant. La réactivité de l'antioxydant ou les mesures de capacité antioxydantes sont basées sur des cinétiques de concurrence. Ces réactions HAT sont indépendantes du solvant utilisé et du pH et sont en général rapides, agissant en quelques secondes ou minutes (Prior *et al.* , 2005).

Les méthodes basées sur le mécanisme SET détectent la capacité de l'antioxydant potentiel de transférer un électron pour réduire un composé ; $X^{*}+AH _> X^{-}+AH^{*+}$.

Les mécanismes SET et HAT se produisent bien souvent ensemble avec différents échantillons dépendamment de l'équilibre ou bilan entre la structure de l'antioxydant et le pH. La réactivité relative des méthodes SET est basée en premier lieu sur la déprotonation et sur le potentiel d'ionisation (IP) du groupe fonctionnel réactif (Wright *et al.* , 2001), par conséquent les réactions SET sont dépendantes du pH ; les valeurs d'IP diminuent en général lorsque le pH augmente impliquant une diminution de la capacité donatrice d'électron avec déprotonation. Les réactions SET sont souvent lentes, par conséquent, le calcul de la capacité antioxydante est basé sur le pourcentage de diminution du radical plus que sur la cinétique.

Les mécanismes d'action antioxydante sont variés ; (1) barrières physiques pour prévenir la génération de ROS ou l'accès de ROS à des sites biologiques importants, par exemple, un filtre UV ou la membrane cellulaire ; (2) des pièges chimiques qui « absorbent » l'énergie et les électrons, en éteignant le ROS, comme par exemple les caroténoïdes et les anthocyanidines ; Les systèmes catalytiques qui neutralisent ou détournent les ROS comme les enzymes antioxydantes (Superoxyde dismutase - SOD), catalase, et gluthation peroxydase (Chaudière & Ferrari-Iliou, 1999); (4) liaison / inactivation des ions métalliques pour prévenir la génération de ROS, par exemple la ferritine, ceruloplasmine, catechine, et les antioxydants « chain-breaking » qui capturent et détruisent les ROS comme par exemple l'acide ascorbique (Vitamine C), le tocophérol (Vitamine E), l'acide urique, le gluthation, et les flavonoïdes (Benzie, 2003).

La valeur totale de la capacité antioxydante doit impliquer l'usage de méthodes applicables aux antioxydants lipophiliques et hydrophiliques qui considèrent les mécanismes de transfert de protons et d'électrons (Karadag *et al.* , 2009), mécanismes principaux permettant à l'antioxydant de désactiver le radical.

Selon leur mécanisme d'action, les antioxydants peuvent être classifiés comme étant primaires, secondaires ou co-antioxydants. Les antioxydants primaires sont capables de donner un atome d'hydrogène rapidement à un radical, en

formant un nouveau radical, qui est plus stable. Les antioxydants secondaires réagissent avec les radicaux initialisant (ou inhibent les enzymes initiatrices), ou réduisent le niveau d'oxygène (sans générer d'espèces radicalaires réactives). Cette catégorie peut retarder le taux de l'initiation du radical en éliminant des initiateurs. Ceci peut être amélioré en désactivant des espèces hautement énergétique (singulet oxygène); en absorbant la lumière UV ; extinction d'oxygène ; en chélatant le métal qui catalyse la réaction du radical libre ou en inhibant des enzymes telles que les peroxydases, la NADPH oxydase, xanthine oxydase, entre autres enzymes oxydantes (Miguel, 2010). Par conséquent il n'existe pas d'antioxydant universel, raison pour laquelle au moins deux méthodes doivent être appliquées pour détecter l'habilité antioxydante d'un échantillon.

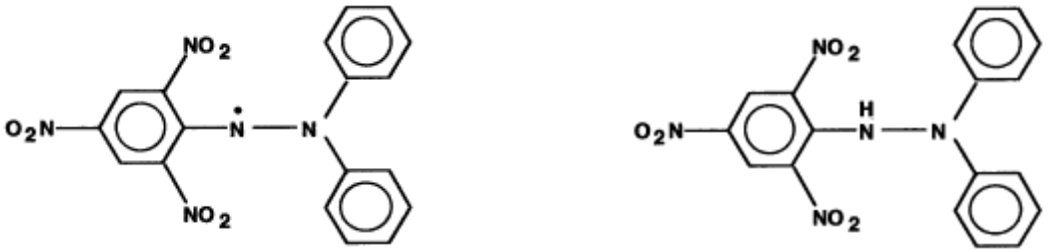
Une des stratégies les plus utilisées *in vitro* pour évaluer la capacité antioxydante totale d'un composé, mélange ou aliment consiste à déterminer l'activité antioxydante avec des substances chromogènes radicalaires dont la perte de couleur est proportionnelle à la concentration (Arena *et al.* , 2001; Moyer *et al.* , 2002). Les méthodes les plus utilisées sont: DPPH, TEAC avec ABTS, ORAC et RFC (Arnao, 2001; R. L. Prior, 2003). Ci-après, seules les méthodes DPPH et TEAC avec ABTS seront décrites compte tenu qu'elles sont les plus couramment utilisées pour caractériser et quantifier l'activité antioxydante des HE.

Bien que les méthodes TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) et DPPH, présentées ci-après, sont en général classifiées comme correspondant à des réactions SET, les deux radicaux correspondants peuvent être neutralisés soit par réduction direct par transfert d'électron ou par « éteinte » du radical via transfert d'atome d'hydrogène (Jiménez *et al.* , 2004).

5.2. Activité antiradicalaire sur le DPPH

La technique utilisant le 2,2-diphényl-1- picrylhydrazyl (DPPH) a été initialement décrite par Blois (1958), puis reprise par Brand-Williams *et al.* (1995). Le DPPH est un radical azoté de couleur violette en solution, due à la délocalisation d'un électron libre de la molécule. Il a une absorption

caractéristique à 517 nm. Une fois réduit par un capteur de radicaux libres, sa couleur disparait. La réaction peut être résumée ainsi ; DPPH+(AH)n -> DPPH-H+(A°)n, (AH)n étant le composé capable de céder un atome d'hydrogène au radical DPPH qui devient alors le diphénylpicrylhydrazine (Brand-Williams *et al.*, 1995) (Figure 11) dont l'apparition est évaluée par mesure de densité optique. Ce dernier peut présenter une couleur jaune caractéristique du groupe picryl.



Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre) (Z•) ***Diphenylpicrylhydrazine (non radical) (ZH)***

Figure 11 . Le radical libre DPPH (Z•) et son homologue réduit (ZH).

L'activité anti radicalaire est exprimée par la Concentration Inhibitrice de 50% de la solution radicalaire (CI_{50} ou EC_{50}) exprimée en µg/ml. La différence d'absorbance à 517 nm traduit la capacité de l'antioxydant de capter le radical DPPH et permet de calculer le Pourcentage d'inhibition de la manière suivante ; PI=[(A0-A1/Ao)]*100, où A0 est l'absorbance à t0 de la solution de DPPH sans antioxydant et A1 celle de la solution de DPPH en présence de l'antioxydant évaluée au temps tx.

Le temps requis pour atteindre la CI_{50} est définie par T_{CI50} dont, dépendamment de la valeur, l'antioxydant sera catégorisé de la manière suivante ; inférieur à 5 minutes : rapide ; entre 5 et 30 minutes : intermédiaire et plus de 30 minutes: lente (Concepción Sánchez-Moreno, Larrauri, & Saura-calixto, 1998). L'équipe de Sanchez-Moreno a défini un paramètre afin d'exprimer la capacité antioxydante : l'efficacité antiradicalaire $EA = (1/EC_{50})*T_{EC50}$.

Cette formule permet d'affiner l'information relative à la réaction car elle considère sa durée.

de Beer *et al.* , (2003) ont défini un autre paramètre similaire ; « Radical Scavenging Eficiency » qui combine l'activité de capture en terme de concentration de radical capturé et celle initiale ;

RSE = [Concentration initiale de radical capturé (durant la première minute)/CI_{50}].

Dans le cas spécifique des composés phénoliques, Brand-Williams *et al.* (1995) proposent trois hypothèses pour expliquer leur efficacité anti-radicalaire;

La première, est une réaction de donation d'hydrogène suivie de la délocalisation du groupe substitué en *para* (Figure 12, Réaction 1). Dans ce modèle, l'eugénol est étudié. Néanmoins, cette hypothèse est valable pour tous les phénols qui possèdent deux ou trois atomes d'hydrogène sur le carbone en position *para* du groupe aromatique.

La deuxième hypothèse propose la dimérisation entre deux radicaux phénoxyles (Figure 12, réaction 2), comme décrite par Pokorný *et al.* (1997) pour le phénol avec la position ortho et para. Après dimérisation, deux groupements hydroxyles régénèrent un transfert intramoléculaire de proton, lequel pourrait réagir avec le DPPH˙.

La troisième hypothèse est la complexion du DPPH˙ avec un radical aryle (Figure 12, réaction 3)

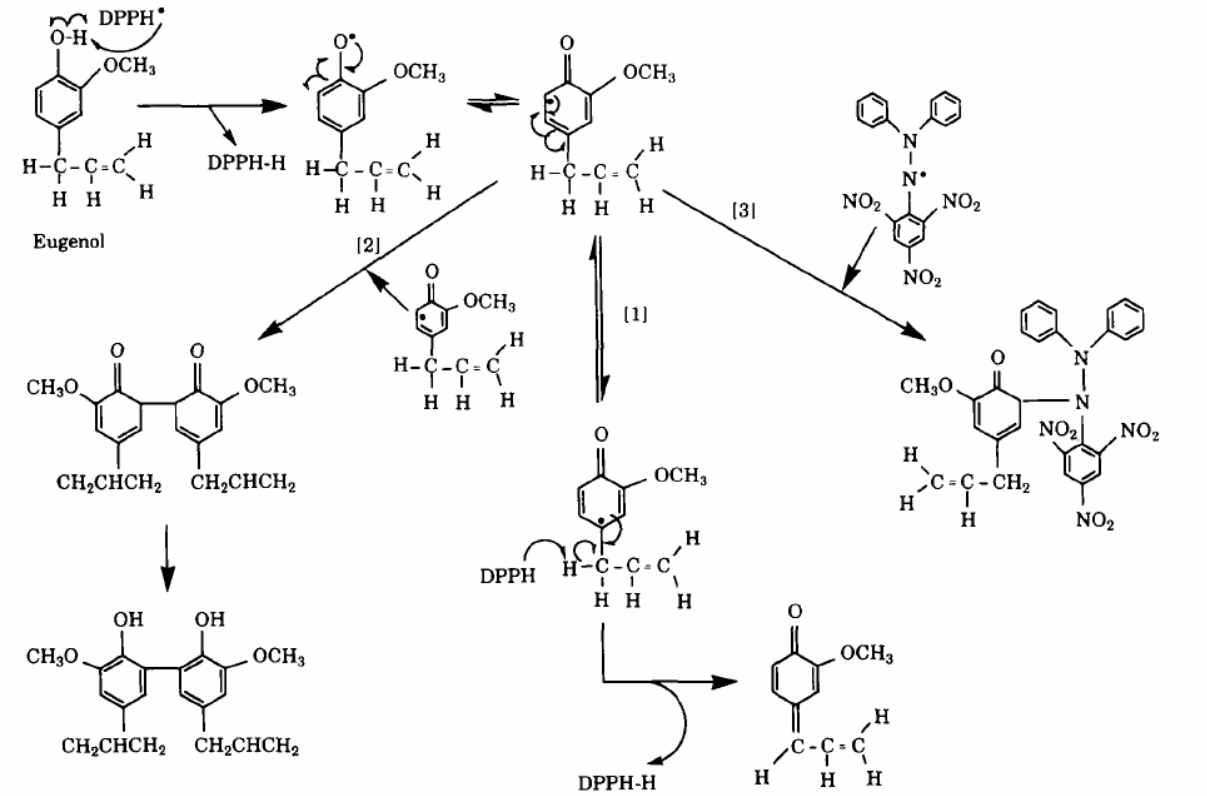


Figure 12. Les trois hypothèses de Brand-Williams concernant l'activité anti-radicalaire des composés phénoliques.

Cette technique est particulièrement simple et permet des mesures rapides lesquelles peuvent être réalisées avec un spectrophotomètre en utilisant une microplaque de 96 puits (Furkumoto & Mazza, 2000), ce qui permet d'analyser de nombreux échantillons.

Bien qu'elle soit simple et rapide, l'interprétation des résultats peut être faussée lorsque l'absorption de l'échantillon testé surpasse celui du DPPH à sa longueur d'onde caractéristique. C'est le cas par exemple de l'eugénol (Huang *et al.* , 2005; Prior *et al.* , 2005). Par ailleurs, la réaction impliquée n'est pas compétitive, puisque le DPPH est à la fois radical et oxydant. La réaction peut impliquer soit un mécanisme HAT soit une réduction SET ainsi que d'autres réactions, l'accessibilité stérique est un déterminant majeur de la réaction. Par conséquent, les petites molécules qui auront un accès facilité au radical, démontreront une meilleure capacité antioxydante avec ce type d'essai (Prior *et al.* , 2005).

Magalhães *et al.* (2008) ont observé qu'au-delà d'une certaine quantité d'eau, la capacité antioxydante de l'échantillon décroit due à la coagulation du DPPH qui le rend moins accessible à l'antioxydant. Il est aussi important de

considérer que le DPPH ne présente aucune similitude avec les radicaux peroxyle impliqués dans la peroxydation lipidique. De ce fait, de nombreux antioxydants qui réagissent avec ces derniers réagiront faiblement ou pas du tout avec le DPPH en raison de l'inaccessibilité stérique (Prior *et al.* , 2005).

Enfin, le DPPH ne peut être dissout qu'en milieux organiques (spécialement en milieu alcoolique), ce qui constitue un inconvénient important au moment d'interpréter le rôle d'antioxydants hydrophiles (Arnao, 2001).

Dans une revue concernant l'usage du DPPH pour l'évaluation de l'activité antioxydante, Molyneux (2004) rappelle qu'un temps de réaction de 30 minutes était initialement recommandé mais que des durées plus courtes ont finalement été appliquées. Il insiste cependant sur les observations faites par Brand-Williams *et al.* (1995) concernant la variabilité du temps de réaction dépendamment du type de substrat et sur l'observation de Sánchez-Moreno *et al.* (1999) qui recommandent que la meilleure manière d'évaluer l'activité antiradicalaire avec le DPPH est de suivre la réaction jusqu'à ce qu'elle atteigne le « plateau » c'est-à-dire, la phase stationnaire.

5.3. Activité antiradicalaire sur l'ABTS

La technique TEAC a initialement été définie par (Miller *et al.* , 1993) et a ensuite été améliorée et fréquemment utilisée pour évaluer l'action antioxydante dans les aliments en utilisant l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthyltiazoline-bencenosulfonique-6 (ABTS) (Re *et al.*, 1999), substrat de la peroxydase, qui lorsqu'il est oxydé par des radicaux peroxyl ou d'autres oxydants en présence d'H_2O_2, génère le radical métastable ABTS+, d'une couleur intense qui peut être mesurée avec un spectrophotomètre entre 600 et 750 nm. La capacité antioxydante est alors évaluée en considérant la capacité du composé étudié à réagir avec le radical ABTS+ ,comparée à celle du Trolox (Roginsky & Lissi, 2005).

L'ABTS peut être obtenu par réaction chimique en utilisant le dioxyde de manganèse ou le persulfate de potassium (Arnao, 2001), par réaction enzymatique (peroxidase, mioglobuline), ou enfin par réaction électrochimique (Ishige *et al.* , 2001; Imeh and Khokhar, 2002). Cette technique permet de

mesurer l'activité de composés naturels hydrophiles et lipophiles (Re *et al.* , 1999; Antolovich *et al.* , 2002). Le spectre de l'ABTS présente des pics d'absorbance à 414, 415, 645, 654, 734, 754 et 815 nm en milieu alcoolique, alors que le DPPH n'en a qu'un seul à 515 nm (Cano *et al.* , 2000; Kim 2002; Sánchez-Moreno *et al.* , 1998). 415 et 734 nm sont les longueurs d'onde les plus utilisées (Cano *et al.* , 2000) Cette méthode permet aussi de travailler avec différents pH bien qu'avec un pH de 7,4 la stabilité du radical est problématique. Cependant Ozgen *et al.* (2006) observent que les valeurs de capacité antioxydante de standards phénoliques étaient meilleures à un pH 7,4 qu'à 4,5.

Parmi les inconvénients de cette technique, il est important de considérer qu'elle caractérise la capacité du composé à réagir avec l'ABTS, et non pas d'inhiber le processus oxydatif. Les essais avec des composés phénoliques seront lents pour atteindre le point final et les valeurs de TEAC seront donc faibles si le temps de lecture défini est court (Huang *et al.* , 2005). Pérez-Jiménez et Saura-Calixto (2008) ont observé des différences, en comparant la capacité antioxydante obtenue à un temps x avec le comportement cinétique de la réaction quand la concentration et le temps nécessaire pour la déplétion du radical étaient considérés. Par exemple, le BHA a une capacité antioxydante plus élevée que l'acide férulique quand les résultats sont comparés au temps final, mais il a une cinétique plus lente que ce dernier. Enfin, le fait que le radical ABTS utilisé dans cette méthode n'existe pas dans des systèmes biologiques et ne ressemble d'ailleurs à aucun d'entre eux, représente aussi un inconvénient de cette méthode (Macdonald-wicks *et al.* , 2006).

Une différence importante entre l'ABTS et le DPPH est que l'ABTS peut être solubilisé en milieux aqueux et organique dans lesquels l'activité antioxydante peut être mesurée dépendamment de la nature hydrophile ou lipophile des composés de l'échantillon (Cano *et al.* , 2000; Arnao *et al.* , 2001).

5.4. Méthode d'analyse de l'activité antimicrobienne

Pour démontrer l'efficacité de la conservation antimicrobienne d'un produit fini, la pharmacopée européenne (version 6.0) préconise la réalisation de l'essai suivant. La surface d'un milieu gélosé B pour les bactéries ou C pour les champignons est initialement ensemencée avec une préparation microbienne de 106 Colony-Forming Units/ml (CFU/ml) de la bactérie en milieu de culture Müller–Hinton et des champignons dans l'agar-agar Sabouraud. Les cultures bactériennes sont incubées à une température de 30-35°C pendant 18-24 h, la culture de C. albicans à une température de 20-25°C pendant 48h et la culture de A. niger à une température de 20-25°C pendant une semaine ou jusqu'à obtention d'une sporulation satisfaisante. La récolte des cultures bactériennes et de C. albicans est effectuée avec un liquide de suspension stérile contenant 9 g/l de chlorure de sodium.

La culture est ensuite dispersée et transférée dans un récipient approprié et le liquide de suspension est ajouté pour réduire la concentration de microorganismes à environ 10^8 CFU/ml.

Dans le cas de *A. niger*, la culture est récoltée en utilisant un liquide de suspension stérile contenant 9 g/l de chlorure de sodium R et 0,5 g/l de polysorbate 80R et le nombre de spores est ajusté à environ 10^8 par millilitre avec la même solution.

Un échantillon de chaque suspension est prélevé immédiatement pour déterminer leur concentration par dénombrement sur plaques ou par filtration sur membranes. Les suspensions sont ensuite utilisées immédiatement.

Une série de récipients du produit que l'on souhaite examiner est ensemencée avec une suspension de l'un des microorganismes d'essai afin d'obtenir un inoculum de 10^5 à 10^6 microorganismes par millilitre ou par gramme de préparation. « Le volume de la suspension de l'inoculum ne doit pas dépasser 1 pour cent du volume du produit ». La préparation est ensuite homogénéisée soigneusement et maintenue à une température de 20-25°C à l'abri de la lumière. Des échantillons seront ensuite prélevés et les microorganismes viables comptés par dénombrement sur plaques ou par filtration sur membrane. Un contrôle approprié (antibiotique) est utilisé à titre comparatif.

La pharmacopée européenne présente deux classes de critères d'acceptation pour évaluer l'activité antimicrobienne d'un produit. Les critères « A » correspondent à l'efficacité qu'il est recommandé d'atteindre. Si ces critères ne peuvent être respectés, par exemple, en raison du risque de réactions indésirables, ce seront les critères B qui s'appliqueront. La Pharmacopée européenne exige différentes qualités microbiologiques des produits pharmaceutiques dépendamment des catégories auxquelles ils appartiennent.

Dans le cadre du présent travail de recherche deux méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne ont été étudiées. La première est la méthode de microdilution pour *E.coli, P. aeruginosa*, *S. aureus et C. albicans* et la seconde est la méthode de dilution en agar, utilisée pour évaluer l'activité des différents extraits contre *A. niger*.

La méthode de microdilution consiste à utiliser de faibles volumes de préparation dans des puits de microplaques. Le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) recommande de réaliser des dilutions initiales dans des volumes finaux d'au moins 10 mL de bouillon en diluant au préalable l'agent non hydrosoluble dans un solvant tel que le Diméthyl sulfoxyde (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006; Institute, 2007).

En raison de l'insolubilité des huiles essentielles ainsi que de l'interaction négative de différents types de solvants exposés précédemment sur leur activité biologique, les recommandations expérimentales de Remmal, 1993; (Remmal *et al.* , 1993 et Balansard 1990) seront prises en considération afin d'adapter les méthodes appliquées à cette propriété des huiles essentielles.

Le BIOSCREEN constitue un outil particulièrement pratique et rapide d'usage pour l'application de cette méthode de microdilution. C'est un système de lecture automatisée de turbidimétrie, lequel, grâce à un système d'incubation, d'agitation et de lecture de 405 à 600 nm, permet rapidement de mettre en évidence les concentrations inhibitrices minimales (CMI) des huiles essentielles et hydrolats testés et l'élaboration de courbes de croissance microbienne tout en éliminant les erreurs manuelles (Johnston, 1998; Rossi-Rodrigues *et al.*, 2009).

Kim *et al.* (2005) reportent l'utilisation du BIOSCREEN C pour évaluer l'activité antibactérienne des molécules volatiles de *Polygonum cuspidatum* sur

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* et 4 autres bactéries pouvant affecter les aliments. Cependant, dans le cadre de cette étude, l'équipe de chercheurs a initialement préparé des solutions d'extraits et de bactéries ayant un volume total de 6mL lesquelles sont ensuite aliquotées dans les microplaques puis lues avec le Bioscreen.

Conclusion

Ce premier chapitre recueille différentes informations officielles et expérimentales concernant les connaissances acquises jusqu'à présent dans le domaine des huiles essentielles combinées et non combinées et les hydrolats. Bien que les espèces étudiées soient communes, la différence entre le nombre d'études scientifiques et usages traditionnels et celui d'indications cliniquement prouvées est particulièrement importante.

L'état de l'art des travaux réalisés antérieurement montre, que la variabilité qualitative et quantitative des constituants chimiques des huiles essentielles et des hydrolats au sein d'une même espèce et chémotype implique des différences de résultats d'activité biologique évaluées *in vitro*. Cette chimiodiversité doit donc être considérée tout particulièrement pour un usage médicinal de qualité en assurant des paramètres de qualité et d'efficacité. Ce sujet sera pris en considération dans les chapitres 2 et 3 suivants concernant respectivement les modes de distillations et les caractérisations chimiques des extraits, puis les activités biologiques des huiles essentielles et hydrolats non combinées et combinées.

CHAPITRE 2 – DISTILLATIONS, CODISTILLATIONS ET CARACTERISATIONS CHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES ET HYDROLATS

Introduction

Ce chapitre présente tout d'abord le mode de production de la matière végétale ainsi que son origine géographique. Deux méthodes différentes de distillation par entrainement à la vapeur avec le matériel végétal de *Rosmarinus officinalis* et *Thymus vulgaris* sont ensuite comparées. De même, les résultats d'analyse chimique de l'HE et l'HD de *Lippia alba,* étudiés ensuite en combinaisons dans le chapitre 3 suivant sont présentés. Finalement les résultats d'analyse chimique de deux codistillations réalisées avec le Thym, le Romarin et le Souci sont présentés et discutés.

1. Matériel et méthodes

1.1. Production et transformation post récolte de la matière végétale

Les conditions de production agricole, récolte et post récolte appliquées pour les quatre plantes dans le cadre de cette étude sont celles appliquées dans la routine productive de l'entreprise dans le cadre de l'élaboration de ses ingrédients et produits finis.

La matière végétale utilisée pour les distillations réalisées dans le cadre de ce projet est issue de cultures agro écologiques réalisées à Usme (2700 msnm) au sud de Bogotá pour le Thym (*Thymus vulgaris*) et le Romarin (*Rosmarinus officinalis*) et près de Guaduas dans le département de Cundinamarca dans le lieu dit la Campeona a 1100 msnm pour le Pronto Alivio (*Lippia alba*). Ces conditions de culture sont caractérisées par des techniques associatives de cultures afin de diversifier la demande édaphique et stimuler des comportements allélopathiques divers et variés des espèces végétales entre elles pour optimiser leur croissance et la qualité de la matière végétale produite. Diverses interactions allélopathiques sont stimulées dans les cultures de la coopérative à Usme et Guaduas telles que l'attraction d'insectes pollinisateurs avec la Bourrache (*Borrago oficinalis*) ou l'enrichissement des sols en azote avec des légumineuses telles que le Chocho (*Lupinus bogotensis)*, espèce colombienne de Lupin. Cette diversité est illustrée dans les Photo 1 et 2 prises dans la ferme à Usme.



Photo 1. Cultures associées de Rue (Ruta graveolens), Souci (Calendula officinalis), Achillée millefeuille (Achillea millefolium) et Bourrache (Borrago officinalis) à la ferme de FARMAVERDE (Usme, Bogota, COLOMBIE)



Photo 2. Cultures associées de Thym (Thymus vulgaris), Camomille (Matricaria recutita) et Achillée millefeuille (Achillea millefolium) à la ferme de FARMAVERDE (Usme, Bogota, COLOMBIE)

Outre la diversité des cultures, l'application de compost et la fumigation d'hydrolats enrichis avec des éléments minéraux intègrent aussi la liste des

pratiques agricoles courantes dans la ferme de la coopérative depuis les semis jusqu'après les récoltes.

Les récoltes du Pronto Alivio, du Romarin, du Souci et du Thym ont été réalisées en période de floraison pour les quatre cultures entre 6 et 10 heures du matin. Le matériel récolté a été séché à l'ombre sur des clayettes dans un séchoir ventilé naturellement (Photo 3) afin de diminuer le contenu en eau de la matière végétale. Dans le cas du Romarin, du Souci et du Thym, ce séchage a été réalisé a une température moyenne de 18ºC à Usme au sud de Bogotá et celui du Pronto Alivio à 26ºC dans les conditions climatiques de Guaduas (département de Cundinamarca). Ces conditions appliquées habituellement, permettent un séchage modéré qui optimise la conservation et la concentration des métabolites secondaires.



Photo 3. Séchage naturel du matériel végétal.

1.2. Description des méthodes de distillation

Le protocole classique de distillation par entraînement à la vapeur et le protocole de macération et distillation par entraînement à la vapeur adapté par Monsieur Miguel Abril, associé de la coopérative FARMAVERDE, méthode intitulée « Distillation Farmaverde » se distinguent par l'usage d'un macérat comme source de vapeur (Figure 13). Ces deux méthodes de distillation ont

été comparées en utilisant le Thym et le Romarin. Chacune de ces espèces a été distillée trois fois en appliquant chacune des deux méthodes. Par ailleurs, le Pronto Alivio a été distillé seulement en utilisant la méthode de distillation conventionnelle et le Souci a été distillé en utilisant la méthode FARMAVERDE, laquelle a aussi été utilisée en codistillation avec le Romarin et le Thym. Les quantités d'eau et de matière végétale utilisées pour chacune des méthodes, sont spécifiées (Tableau 6).

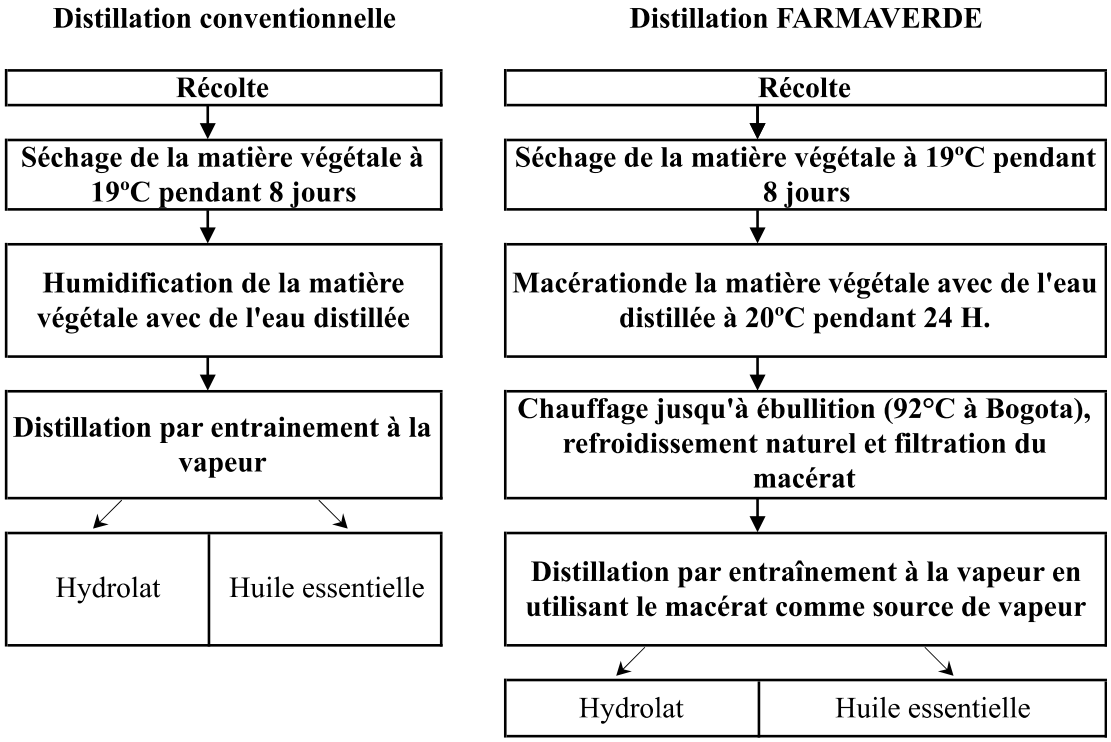


Figure 13. Méthode de distillation conventionnelle et méthode "Farmaverde"



Photo 4. Distillateur utilisé pour l'extraction des huiles essentielles et hydrolats, Miguel Abril et Yann-Olivier Hay.

Dans le cadre de la méthode Farmaverde, une partie de la matière végétale sèche est macérée dans l'eau à température ambiante pendant 24 heures en conditions anaérobiques puis le mélange est chauffé jusqu'au point d'ébullition (92°C à Bogotá, située à 2640 m d'altitude) et refroidit à température ambiante. Ce macérât est ensuite séparé de la matière végétale avec un pressoir muni d'un filtre et utilisé comme source de vapeur pour la distillation par entrainement à la vapeur d'un nouveau volume de matière végétale, avec lequel on obtient l'huile essentielle et l'hydrolat. Le distillateur utilisé pour ces extractions est présenté dans la Photo 4.

Concernant le procédé d'obtention, le rendement et l'activité biologique conséquente de l'HD, il est important de considérer les proportions de matière végétale et d'eau utilisées en comparaison avec celles utilisées par d'autres auteurs (Tableau 6). Différentes conditions de préparation d'échantillons y sont présentés: celles d'un laboratoire d'analyse scientifique (Aazza *et al.*, 2011; Boyraz & Ozcan, 2006; Sagdic & Ozcan, 2003) et celles industrielles présentées par Paolini *et al.* 2008 ainsi que les conditions que nous avons appliquées pour la méthode conventionnelle de distillation dans le cadre de ce projet. Ces dernières conditions sont référencées « Farmaverde » dans (tableau 6). Les différents rapports entre la masse de la matière végétale

sèche et le volume d'hydrolat obtenu, impliquent évidemment des différences en termes d'activité biologique de ce dernier à la différence de l'huile essentielle qui n'est autre que l'extrait pur de la plante.

Sagdic & Ozcan (2003) obtiennent les hydrolats en distillant 50g de plante avec 500 ml d'eau par hydrodistillation. Aazza *et al.* (2011) utilisent 1Kg de matière végétale et obtiennent 2L d'HD suite à la distillation par entrainement à la vapeur. Boyraz & Ozcan (2006) utilisent 200g de matière végétale et 500 ml d'eau mais ne précisent pas la quantité d'HD obtenue. Paolini *et al.* (2008) obtiennent l'HD d'un processus industriel d'hydrodistillation, lequel utilise 500Kg de matière végétale fraiche desquels sont obtenus 200 L d'HD. Dans notre cas, les rapports de matière végétale sèche reportés à la quantité d'hydrolat obtenue en appliquant la méthode conventionnelle de distillation par entrainement à la vapeur, sont de 155 et 207% pour le Thym et le Romarin respectivement.

Les différentes quantités d'eau et de matière végétale utilisées pour chaque espèce et pour chaque protocole de distillation par entrainement à la vapeur ainsi que les rendements obtenus des huiles essentielles et hydrolats ont été mesurées (Tableau 7). L'étude comparative des huiles essentielles et hydrolats de Thym et de Romarin obtenus selon les deux protocoles sera ensuite réalisée ainsi que l'évaluation de leurs activités biologiques conséquentes ainsi que celles de Pronto Alivio et Souci avant d'analyser celles des combinaisons de certains de ces extraits.

Tableau 6. Rendements d'extraction en Hydrolats

Nom scientifique	**Mode de préparation de la matière végétale**	**Mode de distillation**	**Rendement : Matière végétale sèche*/ Hydrolat**	**Référence**
Rosmarinus officinalis	Séchage à température ambiante (Turquie)	Hydrodistillation	0,05 Kg / 0,5 L **(10%)**	Sagdic and Ozcan (2003)
Rosmarinus officinalis	Non spécifié	Distillation par entrainement à la vapeur	1 Kg / 2 L **(50%)**	Aazza *et al.* (2011)
Thymus vulgaris	Non spécifié	Distillation par entrainement à la vapeur	1 Kg / 2 L **(50%)**	Aazza *et al.* (2011)
Satureja hortensis	Séchage à température ambiante (Turquie)	Hydrodistillation	0,2 Kg / 0,5 L **(40%)**	Boyraz & Ozcan (2006)
Rosmarinus officinalis	Matière végétale fraîche	Distillation indirecte par entrainement à la vapeur	500 Kg / 200 L **(250%)**	Paolini *et al.* (2008)
Thymus vulgaris	Séchage à température ambiante (Usme, Bogotá)	Distillation par entrainement à la vapeur	21 Kg / 13,5 L **(155%)**	Farmaverde
Rosmarinus officinalis	Séchage à température ambiante (Usme, Bogotá)	Distillation par entrainement à la vapeur	28 Kg / 13,5 L **(207%)**	Farmaverde

Tableau 7. Volumes, masses et rendements utilisés et obtenus avec les deux méthodes de distillation

	PROTOCOLE DE FARMAVERDE CTA										PROTOCOLE CLASSIQUE					
	Masse de Matière Végétale Sèche (Kg)	Pourcentage de Déshydratation	Masse de matière végétale sèche utilisée pour la macération et décoction (Kg)	Masse du macérat/ décoctat obtenu (Kg)	Masse du macérat/ décoctat utilisé pour la destillation (Kg.)	Masse de matière végétale sèche utilisée pour la destillation (Kg.)	Masse de l'hydrolat obtenu (Kg.)	Masse de l'Huile Essentielle obtenue (Kg.)	Rendement de l'Hydrolat	Rendement de l'Huile Essentielle	Masse de matière végétale sèche utilisée pour la destillation (Kg.)	Masse de l'eau utilisée pour la destillation (Kg)	Masse de l'hydrolat obtenu (Kg.)	Masse de l'Huile Essentielle obtenue (Kg.)	Rendement de l'Hydrolat	Rendement de l'Huile Essentielle
Thymus vulgaris	29,1	29,7%	8,0	58	55	21,1	13,5	0,018	64,1%	0,09%	21,1	55	13,5	0,019	64,1%	0,09%
	29,0	29,7%	8,0	58	55	21,0	13,5	0,018	64,3%	0,09%	21,0	55	13,5	0,020	64,3%	0,10%
	28,1	29,7%	8,0	58	55	20,1	13,5	0,018	67,3%	0,09%	21,0	55	13,5	0,019	64,4%	0,09%
Rosmarinus officinalis	35,5	58,8%	7,0	58	55	28,5	13,5	0,084	38,0%	0,29%	28,5	55	13,5	0,081	47,4%	0,28%
	35,0	58,8%	7,0	58	55	28,0	13,5	0,083	38,5%	0,30%	28,0	55	13,5	0,081	48,2%	0,29%
	35,2	58,8%	7,0	58	55	28,2	13,5	0,083	38,4%	0,29%	28,2	55	13,5	0,082	47,9%	0,29%
Lippia alba	19,0	26,3%	-	-	-	-	-	-	-	-	19,0	55	13,5	0,09	0,710526	0,47%
Calendula officinalis	6,2	20,7%	6,0	58	55	24,0	13,5	0	217,7%	0	-	-	-	-	-	-

1.3. Analyse chimique des huiles essentielles et hydrolats

Les analyses chromatographiques CPG-FID des huiles essentielles ont été réalisées avec un chromatographe Varian 3900 équipé avec un détecteur à ionisation de flamme (FID) et une colonne Elite 5 MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Perkin Elmer, Nederland). Le débit d'hélium était de 1mL/min, la température de l'enceinte de la colonne était initialement de 50ºC pendant 2 min, puis augmentait de 4°C/min à 160ºC, puis de 8°C/min pour atteindre les 220ºC et de 15°C/min jusqu'à 280ºC pendant 5 min. La température de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 250ºC et 290ºC. 1 µL de chaque HE a été injecté en mode split de 1:200.

Les analyses CPG-SM des huiles essentielles ont été réalisées avec un chromatographe en phase gazeuse Agilent Technologies, 6850 Series II, muni d'un échantillonneur 6850 (Automatic Liquid Sampler - ALS) et équipé d'un détecteur de masse 5975B utilisé en mode "balayage complet" (full scan) de 30 à 500 unités de masse atomique. Deux colonnes ont été utilisées pour l'analyse de chaque échantillon en GC-MS ; une DB-5MS (5% phényl méthylpolysiloxane) de 60 m × 0,25 mm × 0,25 µm et une HP-INNOWAX de 60 m × 0,25 mm × 0,25 µm.

La quantité d'échantillon injectée était de 1 µl avec un split de 200 à 1. Le débit d'hélium était de 1 ml/min. La programmation de la température du four pour toutes les analyses d'HE : 50°C durant les 2 premières minutes, puis 4°C/min jusqu'à 160°C, température maintenue pendant 5 minutes, puis 8°C/min jusqu'à 220°C, 2 minutes à 220°C et 15°C/min jusqu'à 280, 5 minutes à 280°C. La température de l'injecteur était de 250°C, celle de la source d'ionisation de 230°C et du quadripôle de 150°C. Les spectres de masse ont été enregistrés en mode d'impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV. Les composés des différents échantillons ont été identifiés par comparaison avec les indices de rétention de la base de données NIST 2005 et les indices de rétention reportés par Adams (2007) et ceux d'autres références bibliographiques.

L'analyse des hydrolats a été réalisée après extraction et concentration des composés de l'espace de tête en utilisant la technique « Solid-phase

microextraction en mode headspace (HS-SPME) avec une fibre adsorbante bipolaire, de silice revêtue de 65µm d'une couche de Polydimethylsiloxane / Divinylbenzene (PDMS/DVB) de Supelco (Bellefonte, PA, USA). Le protocole suivant a été appliqué :

6 mL de chaque échantillon d'hydrolat sont déposés dans un flacon de 10 ml qui est ensuite hermétiquement bouché puis chauffé à 40°C sous une agitation de 800 rpm pendant 15 minutes afin de libérer les molécules volatiles dans l'espace de tête du flacon.

Après conditionnement et avant chaque usage, la fibre de silice est désorbée de contaminants éventuels dans le port d'injection du chromatographe pendant 30 minutes à 250ºC. Ensuite, l'aiguille qui contient la fibre rétractable est introduite dans l'espace de tête du flacon où cette dernière est ensuite déployée pour rester en contact de cet espace pendant 20 minutes, en maintenant le flacon contenant l'échantillon à la même température et agitation que précédemment.

La fibre est ensuite insérée dans le port d'injection du chromatographe pour l'injection des composés volatils et laissée pendant les dix premières minutes de la séquence chromatographique. Les analyses chromatographiques des hydrolats ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour les huiles essentielles.

2. Résultats et discussion

2.1. Thymus vulgaris

Les rendements obtenus en huiles essentielles de Thym avec les deux méthodes de distillation sont en moyenne de 0.1% par rapport à la matière végétale sèche initiale. Ces huiles essentielles se distinguent principalement au niveau de leurs concentrations en thymol et p-cymène, molécules qui déterminent les chémotypes respectifs de chacune des HE.

Les HE obtenues avec la méthode conventionnelle présentent des concentrations majoritaires en thymol qui oscillent entre 36.1% et 39.8% et possèdent des quantités de p-cymène variant de 28.1% à 29.3%. Par contre, les HE obtenues avec la méthode Farmaverde sont caractérisées par une teneur en p-cymène majoritaire comprise entre 36.8% et 37.7% et ne

contiennent qu'entre 26.7% et 27.6% de thymol. Les compositions relatives de chacune des six huiles obtenues ont été analysées (Tableau 8). Dans les chromatogrammes obtenus en CPG-SM des lots d'HE de Thym obtenus avec la méthode conventionnelle et ceux obtenus avec la méthode Farmaverde (
Figure 14), les différences entre les pics correspondants au p-cymène (temps de rétention: 11,7 min) et au thymol (temps de rétention: 28,9 min) sont observables. Les résultats d'analyse obtenus permettent de conclure que la répétabilité des distillations réalisées selon les deux protocoles est correcte.

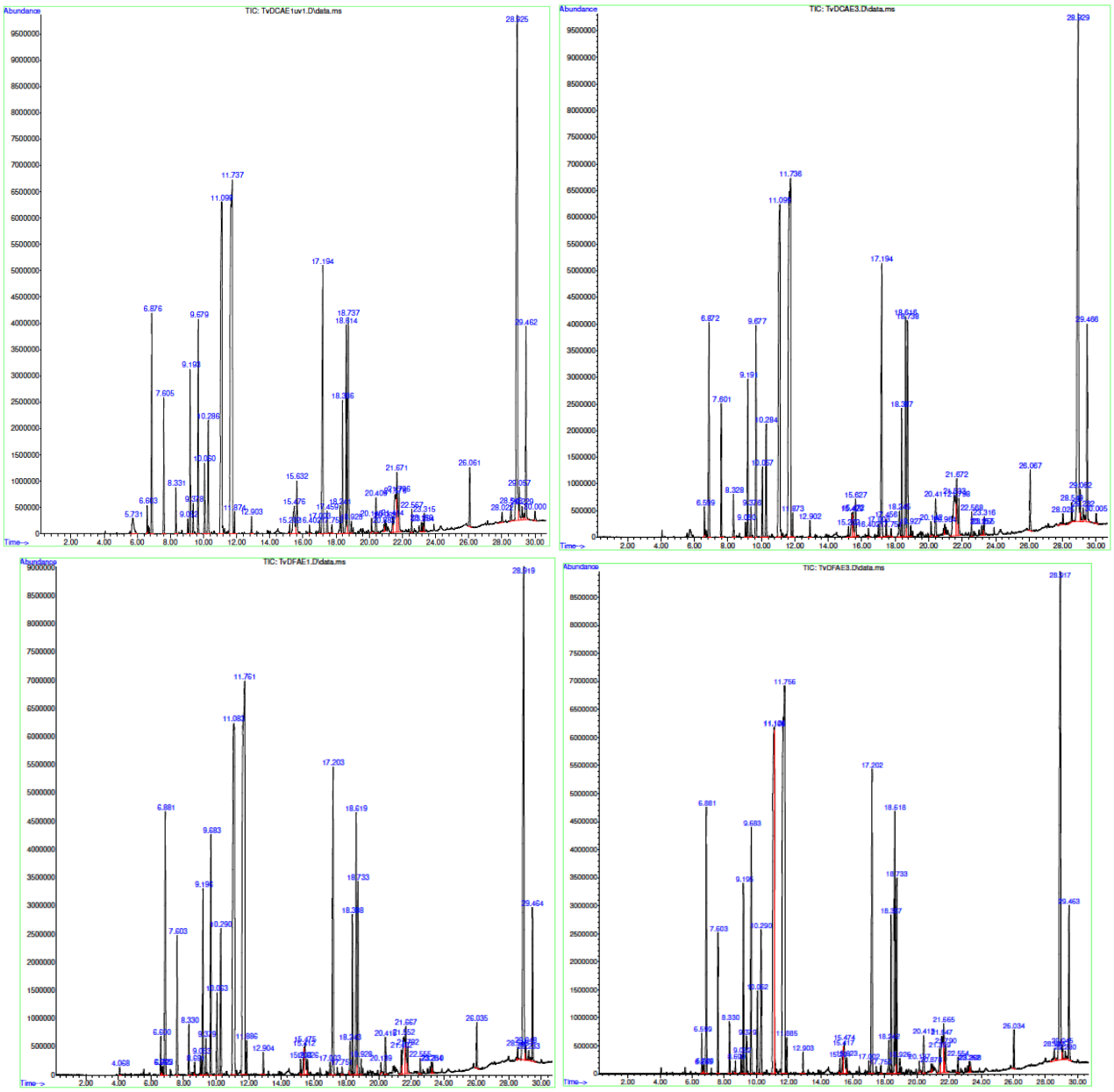


Figure 14. Profils chromatographiques CPG-SM des lots TvDCHE1 et TvDFHE1 (à gauche en haut et en bas respectivement) et des lots TvDCHE3 et TvDFHE3 (à droite en haut et en bas respectivement). Pics caractéristiques et temps de rétention respectivement: gamma terpinène : 11.09 ; p-cymène : 11.7; linalol : 17.2 ; Caryophyllène : 18.7 ; thymol : 28.9.

Neuf composés ont été identifiés dans les six HE de Thym. Ces composés représentent entre 86.5% et 87.2% des HE obtenues par distillation conventionnelle et entre 85.7% et 86.6% des HE obtenues avec la méthode Farmaverde de distillation. Dans les hydrolats obtenus avec la méthode conventionnelle, et dans les conditions analytiques décrites, cinq composés représentent entre 80.3% et 87.5% de l'espace de tête et ceux obtenus avec la méthode Farmaverde entre 88.4% et 93.1%.

Les compositions des HE étaient homogènes dans chaque groupe de distillation. Aucune différence qualitative ou quantitative n'a été observée. Les composés majoritaires identifiés dans les HE obtenues avec la méthode de distillation conventionnelle sont les suivants: le thymol (36.1 ; 39.4 ; 39.8%), le p-cymène (28.4 ; 28.1 ; 29.3%), le ϒ-terpinène (11.6 ; 9.5 ; 7.4%) et le linalol (3.2 ; 3.1 ; 3.1%). Dans les HE de Thym obtenues avec la méthode Farmaverde, les composés majoritaires étaient: le para cymène (27.7 ; 36.8 ; 36.8%), le thymol (27.3 ; 26.7 ; 27.6%) le ϒ-terpinène (10.8 ; 12.3 ; 11.0%) et le linalol (3.9 ; 3.8 ; 3.9%).

De manière surprenante, bien que les HE obtenues avec la méthode développée par Farmaverde présentent de fortes concentrations en p-cymène, les hydrolats correspondants ne contiennent pas cette molécule qui est cependant présente dans les hydrolats obtenus en utilisant la méthode de distillation conventionnelle. Tous les hydrolats de Thym obtenus avec la méthode de distillation développée par Farmaverde contiennent le 1.8-cinéol et le camphre avec des gammes de concentrations respectives de 3.7-5.1% et 7.1-9.4%. Par contre, ceux obtenus par la méthode de distillation classique ne contiennent pas ces molécules, mais possèdent du linalol entre 2.3 et 3.2% qui n'était pas visible dans les hydrolats précédents et des pourcentages relatifs plus importants de carvacrol. Les différences moléculaires sont visibles dans les chromatogrammes présentés dans la Figure 15, lesquels correspondent aux lots TvDCHD1 et TvDFHD1 respectivement.

La différence phytochimique entre les 2 groupes d'HE obtenues par les deux méthodes de distillation montre que ces dernières peuvent aussi avoir un impact sur leur composition chimique. Compte tenu des résultats obtenus ici, il semblerait qu'outre le stade phénologique de la plante, le mode de distillation influence aussi l'expression des composés terpéniques ou des phénols. Ces deux facteurs doivent donc être pris en considération dépendamment des activités des HE et HD désirées. Si l'on souhaite une forte activité antimicrobienne on récoltera donc le Thym en stade de floraison avancée et on le distillera avec la méthode conventionnelle de distillation par entrainement à la vapeur. Par contre, si l'on souhaite obtenir une HE pour un usage spécifique de relaxation musculaire dans laquelle la concentration du p-cymène sera plus élevée que celle du thymol, on récoltera la plante au stade bouton et on distillera le matériel végétal avec la méthode de distillation développée par Farmaverde. Ce type de différence a été mis en évidence par Jordan *et al.* (2006) qui ont démontré dans leur étude concernant les HE de *Thymus vulgaris* et *T. hyemalis*, des variations notables établies entre l'étape phénologique et la dynamique de la séquence *ϒ-terpinène → p-cymène → thymol.* Ces variations rappellent aussi celles reportées par Lamy *et al.* (1979) d'un point de vue phénologique en distillant les feuilles et fleurs de Thym à différentes étapes pré et post floraison. Les auteurs avaient aussi mis en évidence des variations de concentrations relatives du Thymol, p-cymène, ϒ-terpinène et carvacrol.

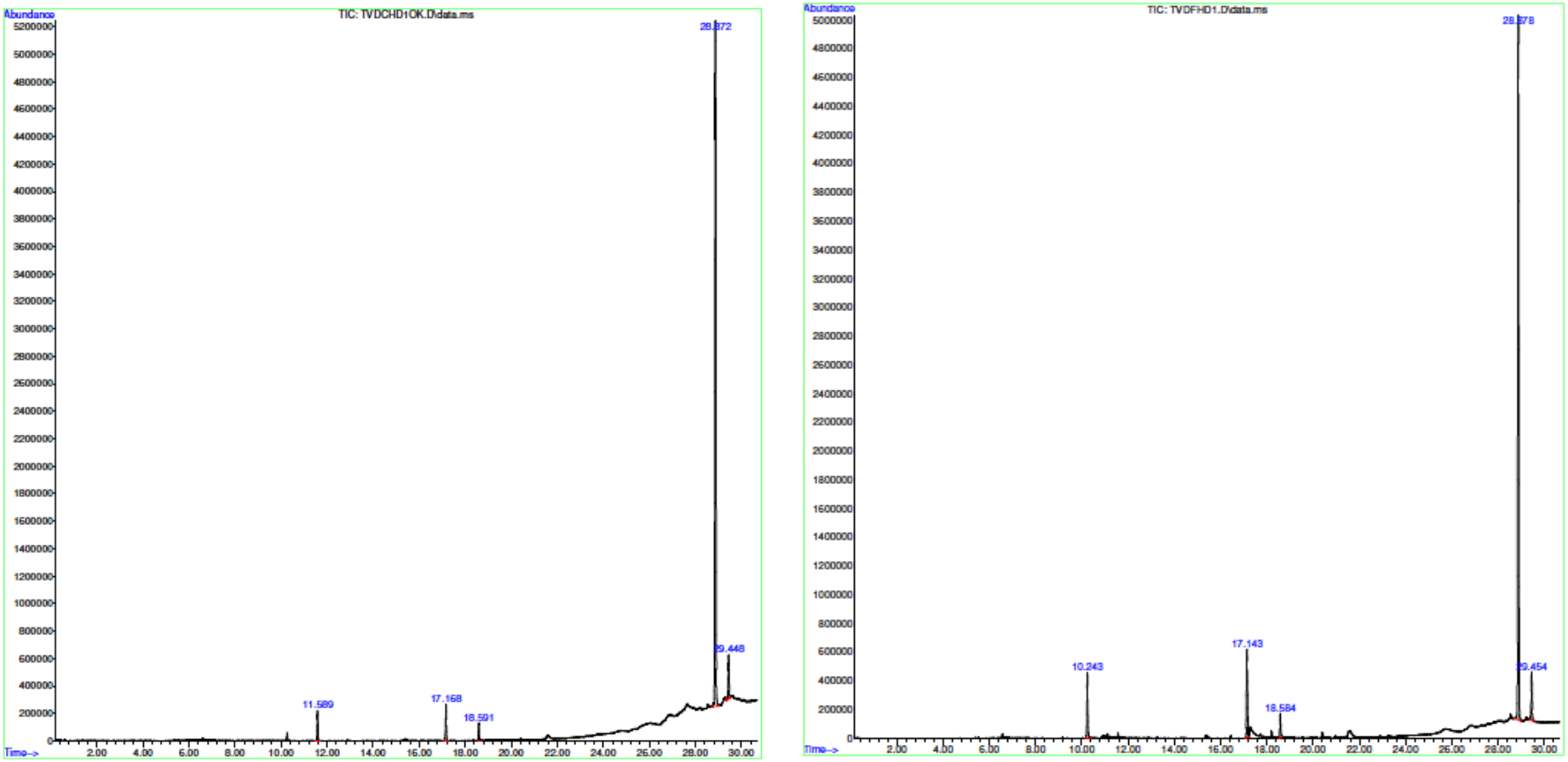


Figure 15. Profils chromatographiques des lots TvDCHD1 et TvDFHD1 obtenus en CPG-SM avec la colonne INNOWAX avec les pics caractéristique du p-cymène au temps 11.5 min, le thymol à 28.8 min et carvacrol à 29.4 min.

Tableau 8. Composition des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis et Thymus vulgaris obtenues par deux méthodes de distillation par entrainement à la vapeur.

				Huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis**						Huiles essentielles de *Thymus vulgaris**					
Composés	IR[a]	IRT[b]	IR[c]	RoCH E1	RoCH E2	RoCH E3	RoFH E1	RoFH E2	RoFH E3	TvCH E1	TvCH E2	TvCH E3	TvFH E1	TvFHE 2	TvFH E3
Monoterpène hydrocarbonés															
α-Pinène	935	939	1038	10,1	10,2	10,2	8,5	9,8	9,4	1,2	1,0	1,0	1,2	1,2	1,1
Camphène	952	953	1087	8,7	8,8	8,7	7,7	8,6	8,3						
β-Pinène	980	980	1129	7,1	7,1	7,1	6,3	6,8	6,6						
β-Myrcène	991	991	1173	2,9	2,9	2,9	2,8	2,9	2,8	1,3	1,1	1,1	1,5	1,5	1,5
α-Phellandrène	1008	1005	1183	1,2	1,2	1,2	0,8	1,0	1,0						
α-Terpinène	1019	1018								1,7	1,5	1,3	1,5	1,7	1,4
p-Cymène	1033	1030								28,4	28,1	29,3	37,7	36,8	36,8
Limonène	1036	1035													
γ -Terpinène	1060	1062	1264	1,4	1,4	1,4	1,0	1,2	1,2	11,6	9,5	7,4	10,8	12,3	11,0
Monoterpènes oxygénés															
1,8-Cineole	1037	1033	1233	21,1	21,1	21,0	21,5	21,4	20,9						
Linalol	1107	1107								3,2	3,1	3,1	3,9	3,8	3,9
Camphre	1156	1143	1557	29,2	29,0	29,0	31,2	29,4	30,3						
Terpinèn-4-ol	1179	1177	1638	4,0	4,0	4,0	3,9	4,2	4,5	1,3	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2
Verbénone	1213	1205	1816	2,1	2,1	2,1	2,5	2,2	2,4						
Sesquiterpène hydrocarboné															
β-Caryophyllene	1423	1418								2,2	2,2	2,2	1,3	1,4	1,2
Composés aromatiques															
Thymol	1310	1289	2410							36,1	39,4	39,8	27,3	26,7	27,6
Carvacrol	1316	1298	2440										1,4		
Total identifié				89.0	88.8	88.8	86,2	87,6	87,3	87.0	87.2	86.5	87,8	86,6	85,7

*RoCHE (1 to 3) et TvCHE (1 to 3) sont les pourcentages relatifs des huiles essentielles analysées par CPG-FID et obtenues par la distillation conventionnelle par entrainement à la vapeur du Romarin et du Thym respectivement.
*RoFHE (1 to 3) et TvFHE (1 to 3) sont les pourcentages relatifs des huiles essentielles analysées par CPG-FID pour les huiles essentielles obtenues par la distillation développée par entrainement à la vapeur du Romarin et du Thym respectivement.
[a]IR sont les indices de rétention avec une colonne Elite-5 MS, [b]IRT sont les indices de rétention théorique obtenues avec une colonne DB5 (Adams, 2007) et [c]IR les indices de rétention obtenues avec une colonne HP-INNOWAX.

Tableau 9. Composition des hydrolats de Rosmarinus officinalis et Thymus vulgaris obtenues par deux méthodes de distillation par entrainement à la vapeur.

			*Hydrolat de Rosmarinus officinalis**						*Hydrolat de Thymus vulgaris**					
Composés	IR[a]	IRT[b]	RoC HD1	RoC HD2	RoC HD3	RoFH D1	RoFH D2	RoFH D3	TvCH D1	TvC HD2	TvC HD3	TvF HD1	TvFH D2	TvF HD3
Monoterpène hydrocarboné														
p-Cymène	1290	1282							2,3	1,5	2,1			
Monoterpènes oxygénés														
1.8-Cinéol	1226	1214	26,9	26,4	28,0	31,7	28,5	28,7				5,1	3,7	4,1
Linalol	1554	1570							3,2	3,2	2,3			
Camphre	1555	1532	37,7	35,9	30,4	41,0	36,3	38,1				9,4	7,1	7,4
Terpinèn-4-ol	1637	1616	2,4	2,4	3,1	3,4	2,5	3,0	1,5	1,5	1,1	1,8	1,7	1,6
Verbénone	1813	1733	3,4	3,7	5,0	4,2	3,6	5,1						
Bornyl acétate	1608	1580	1,2	0,7	1,1	1,1	1,3	2,0						
α-Terpinéol	1824	1720	1,9	2,1	3,0	2,4	2,0	2,6						
Bornéol	1879	1642	5,7	5,0	8,0	7,4	5,6	5,2						
Cétones aliphatiques														
3-Octanone	1267	1270	2,6	1,9	1,2	3,2	3,0	3,4						
Composés aromatiques														
Thymol	2408	2410							74,7	63,8	62,1	71,7	71,3	72,6
Carvacrol	2440	2445							5,8	13,1	12,8	5,1	4,6	4,2
Total identifié			81,8	78,1	79,8	94,4	82,9	88,1	87,5	83,0	80,3	93,1	88,4	90,0

*RoCHD (1 to 3) et TvCHD (1 to 3) sont les pourcentages relatifs des aires des analyses par CPG-SM pour les hydrolats obtenus par distillation conventionnelle par entrainement à la vapeur avec le Romarin et le Thym respectivement et RoCFHD (1 to 3) et TvCFHD (1 to 3) sont les pourcentages relatifs des aires des analyses par CPG-SM pour les hydrolats obtenus par la distillation par entrainement à la vapeur adaptée par Farmaverde.
IR[a] sont les indices de rétention avec la colonne HP-INNOWAX et [b]IRT: indices de rétention théorique obtenus avec une colonnne équivalente (CARBOWAX 20M o DB Wax), dans la base de donnée online Pherobase (http://www.pherobase.com).

2.2. *Rosmarinus officinalis*

Les rendements obtenus en huile essentielle de Romarin avec les deux méthodes de distillation sont de 0.3% par rapport à la matière végétale sèche. Les compositions relatives des HE et HD de cette espèce végétale sont présentées dans les tableaux 7 et 8. Le chémotype camphre est retrouvé pour toutes les HE obtenues en utilisant les deux méthodes de distillation. Onze molécules qui représentaient entre 88.8 et 89.0% du total, ont été identifiées dans les HE de Romarin obtenues avec la méthode de distillation conventionnelle. Dans les HE de Romarin obtenues avec la méthode Farmaverde, dix molécules identifiées représentaient entre 86.0% and 87.6%. Dans tous les hydrolats de cette même espèce, huit composés ont été identifiés dans les conditions analytiques décrites et représentent entre 78.12% et 81.8% dans les HD obtenus avec la méthode conventionnelle et varient de 79.6% à 92.0% dans ceux obtenus avec la méthode développée par Farmaverde. Les résultats d'analyse obtenus et présentés dans les Tableau 9 permettent de conclure que la répétabilité des distillations réalisées selon les deux protocoles est correcte.

Les composés majoritaires identifiés dans les HE de Romarin obtenues avec la méthode de distillation conventionnelle sont les suivants: le camphre (29.2 ; 29.0 ; 29.0%), le 1.8 cinéol (21.1; 21.1; 21.0%), l' α-Pinène (10.1; 10.2; 10.2%), le camphène (8.7; 8.8 ; 8.7%), le β-Pinène (7.1; 7.1; 7.1%) et le terpinen-4-ol (4.0; 4.0; 4.0%). Dans les HE obtenues avec la méthode Farmaverde, les composés majoritaires sont: le camphre (31.2 ; 29.4 ; 30.3%), le 1.8 cinéol (21.5 ; 21.4 ; 20.9%), l' α-Pinène (8.5 ; 9.8 ; 9.4%), le camphène (7.7; 8.6; 8.3%), le β-Pinène (6.3; 6.8; 6.6%) et le terpinèn-4-ol (3.9 ; 4.2 ; 4.5%). Seul, l' α-Pinène présente une concentration légèrement inférieure dans les HE obtenues avec cette dernière méthode en comparaison avec celles obtenues avec la méthode de distillation conventionnelle. Les chromatogrammes obtenus en CPG-SM sont présentés dans la Figure 16.

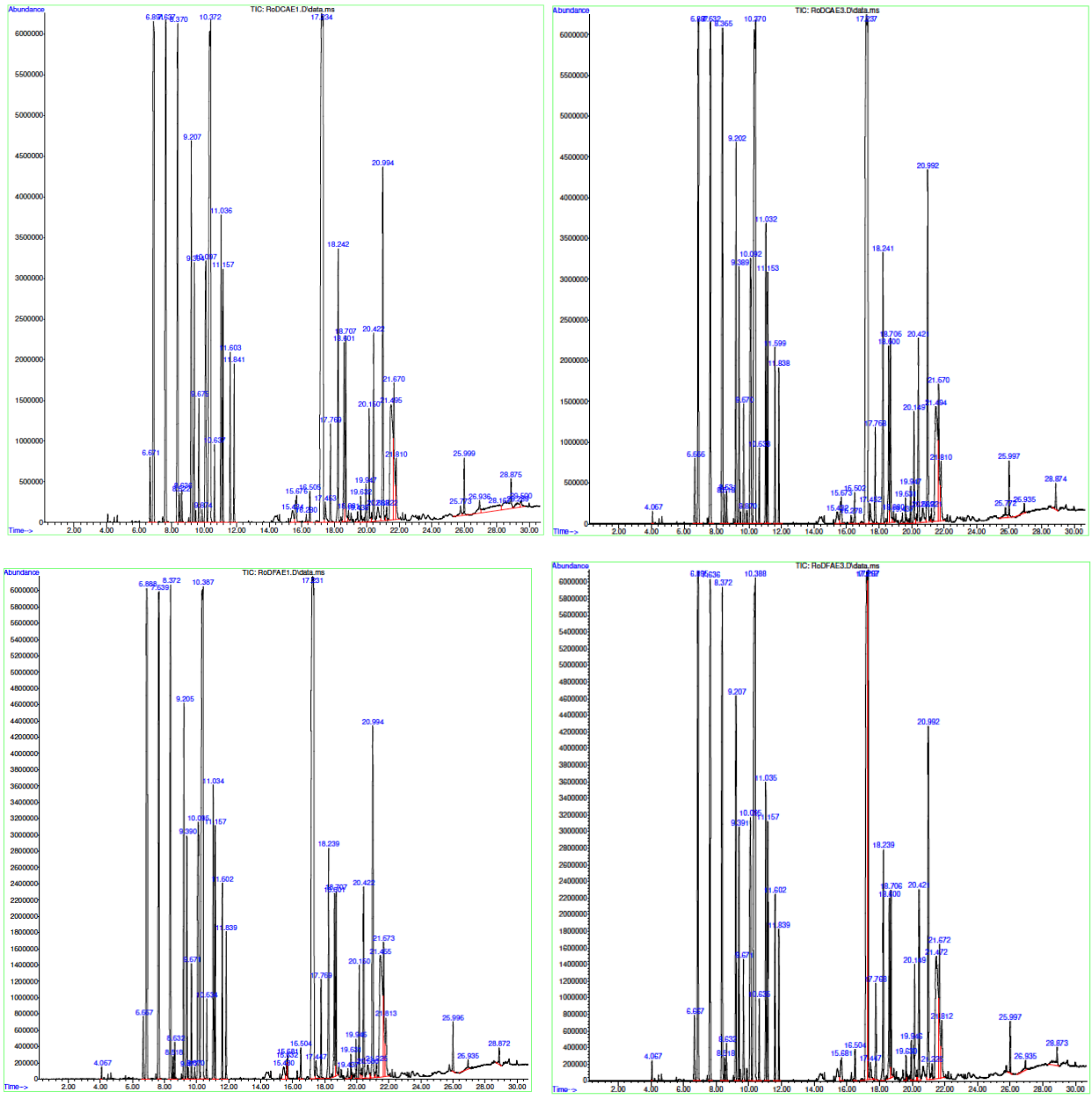


Figure 16. Profils chromatographiques CPG-SM des lots RoDCAE1 et RoDFAE1 (à gauche en haut et en bas respectivement) et des lots RoDCAE3 et RoDFAE3 (à droite en haut et en bas respectivement). Pics caractéristiques et temps de rétention respectivement: alpha-pinène : 6.9 ; camphène : 7.6; béta-pinène : 8.3 ; limonène : 10.1 ; 1.8 cinéol : 10.3; camphre : 17.2 ; verbénone : 20.9 ; bornéol : 21.5.

2.3. *Lippia alba*

Le rendement de l'HE de Pronto Alivio obtenu par rapport à la matière végétale sèche est de 0.5%. Les pourcentages relatifs des aires correspondants aux HE et HD analysés en CPG-FID et CPG-SM respectivement de cette espèce végétale confirment un chémotype carvone bien que la concentration relative du limonène soit très proche de celle de ce dernier (Tableau 10). Cependant, c'est la carvone qui est majoritaire avec une teneur dans l'HE de 41.6%. 6 molécules représentant 94.4% ont été reportées dans l'HE de *Lippia alba* avec les composés majoritaires suivants : Carvone (41.6%), Limonène (40.6%), Germacrène D (8.1%) et Pipériténone (1.8%). Dans l'hydrolat, les 4 molécules suivantes représentant un total de 95.7% ont pu être identifiées : Carvone (92.7%), Eucarvone (2.9%), Limonène (1.6%) et Camphre (1.5%). La composition chimique de cette HE de *L. alba* est proche de celle observée par Stashenko *et al.* (2004) dans la région de Bucaramanga en Colombie avec des pourcentages respectifs de carvone et limonène de 42% et 28%.

Tableau 10. Composition de l'hydrolat et de l'huile essentielle de Lippia alba obtenues par la méthode conventionnelle de distillation par entrainement à la vapeur.

				Lippia alba %[*]	
Composés	IR[a]	IRT[b]	IR[c]	Hydrolat	Huile essentielle
Monoterpène hydrocarbonés					
Limonène	1036	1035	1215	7,2	40,6
Monoterpènes oxygénés					
1,8-Cineole	1037	1033	1233	1,6	
Camphre	1156	1143	1557	3,5	
Géranial	1266	1270			1,3
Sesquiterpène hydrocarboné					
β-Bourbonene	1385	1384			1,1
Germacrene D	1487	1480	1859	2,6	8,1
Cétones aliphatiques					
Carvone	1259	1242	1899	71,1	41,6
Eucarvone			2168	6,1	
Piperitenone	1345	1342			1,8
Carvacrol	1316	1298	2408	2,9	
Total identifié				95,0	94,5

[a]IR, Indices de Rétention calculés avec la colonne Elite-5MS utilisée pour l'analyse CPG-FID de l'huile essentielle.
[b]IRT sont les indices de rétention théoriques obtenus avec une colonne DB5 (Adams, 2007)
[c] IR, Indices de Rétention calculés avec la colonne INNOWAX utilisée pour l'analyse de l'hydrolat.
[*] Pourcentages relatifs des aires des analyses CPG-FID pour l'HE et CPG-SM pour l'HD avec la colonne INNOWAX.

2.4. Distillations simultanées

Trois distillations simultanées ou co-distillations, présentées ci-après en nommant les plantes dans l'ordre des couches disposées dans le distillateur de haut en bas ont été réalisées en appliquant la méthode de distillation par entrainement à la vapeur adaptée par Farmaverde:

- Thym, Souci et Romarin (Code: 3PD1)
- Romarin, Souci et Thym (Code: 3PD2)
- Thym et Romarin (Code : TvRo)

Chacune des co-distillations a été réalisée une seule fois.

Les fleurs de Souci n'ont volontairement pas été disposées en bas du distillateur afin d'éviter qu'elles obstruent le passage de la vapeur d'eau, ce qui pouvait créer des canaux de circulation de la vapeur d'eau et donc diminuer l'homogénéité du passage de celle-ci à travers le matériel végétal.

Pour chaque co-distillation, les différentes quantités d'eau et de matière végétale utilisées pour chaque espèce et les rendements obtenus des huiles essentielles et hydrolats ont été mesurées (Tableau 11).

Les résultats d'analyse de la composition chimique des huiles essentielles obtenues lors des co-distillations 3PD1 et 3PD2 ont été comparés avec les moyennes de compositions des 3 lots d'HE de Thym et Romarin obtenues avec la méthode de distillation Farmaverde (Tableau 12). Seules les molécules présentant une teneur supérieure ou égale à 1% sont présentées.

La comparaison des compositions chimiques des HE obtenues avec les co-distillations 3PD1, 3PD2 et celles des HE des plantes isolées met en évidence quelques différences quantitatives. De même, les proportions de 1.8-cinéole et de camphre, molécules majoritaires de l'huile essentielle de Romarin diminuent de moitié dans les HE obtenues lors des co-distillations 3PD1 et 3PD2.

Tableau 11. Volumes et masses utilisés et rendements obtenus avec les 3 codistillations

		Masse Matière Végétale Fraîche (Kg)	Masse Totale Sèche (Kg)	Masse de matière végétale sèche utilisée pour la macération/ décoction (Kg)	Masse de l'eau utilisée pour la macération/ décoction (Kg)	Masse du macérat / décocta t obtenu (Kg)	Masse du macérat / décocta t utilisé pour la destillati on (Kg.)	Masse de matière végétale sèche utilisée pour la destillati on (Kg.)	Masse de l'hydrola t obtenu (Kg.)	Rendemen t de l'Huile Essentielle	Rendement de l'Hydrolat	Masse de l'Huile Essentiel le obtenue (Kg.)
#1 *Thymus vulgaris* et *Calendula officinalis* sur *Rosmarinus officinalis*	Tv	63,8	19,0	3	69,6	58	55	16,0	15	0,028	45,5%	0,08%
	Co	18,0	4,0	1				3,0				
	Ro	58,5	18,0	4				14,0				
#2 *Rosmarinus officinalis* et *Calendula officinalis* sur *Thymus vulgaris**	Ro	58,5	18,0	4	69,6	58	55	14,0	15	0,028	45,5%	0,08%
	Co	18,0	4,0	1				3,0				
	Tv	63,8	19,0	3				16,0				
Rosmarinus officinalis sur *Thymus vulgaris*	Ro	40,3	12,0	3	69,6	58	55	9,0	15	0,021	60,0%	0,08%
	Tv	63,4	19,5	4				16,0				

Tableau 12. Compositions des huiles essentielles obtenues par les codistillations 3PD1, 3PD2 comparées à celles des huiles essentielles de Romarin (RoFHE) et Thym (TvFHE)(%).

Composés	IR[a]	IRT[b]	RoFHE[b]	TvFHE[b]	3PD1 HE[c]	3PD2 HE[c]
Monoterpène hydrocarbonés						
α-Pinène	935	939	9,2 ± 0,7	1,2 ± 0,1	5,2	8,8
Camphène	952	953	8,2 ± 0,5		4,8	7,0
β-Pinène	980	980	6,6 ± 0,3		3,9	5,8
β-Myrcène	991	991	2,8 ± 0,1	1,5 ± 0,0	2,3	2,4
α-Phellandrène	1008	1005	0,9 ± 0,1		0,7	0,9
α-Terpinène	1019	1018		1,5 ± 0,2	1,2	0,9
p-Cymène	1033	1030		37,1 ± 0,5	6,8	4,6
Limonène	1036	1035			2,5	3,6
γ -Terpinène	1060	1062	1,1 ± 0,1	11,4 ± 0,8	9,6	4,4
Monoterpènes oxygénés						
1,8-Cineole	1037	1033	21,3 ± 0,3		12,7	9,9
Linalol	1107	1107		3,9 ± 0,1	1,4	0,6
Camphre	1156	1143	30,3 ± 0,9		16,8	15,4
Terpinèn-4-ol	1179	1177	4,2 ± 0,3	1,2 ± 0,0	2,2	2,5
Verbénone	1213	1205	2,4 ± 0,2			
Borneol		1165				
Sesquiterpène hydrocarboné						
β-Caryophyllene	1423	1418		1,3 ± 0,1	0,9	1,4
Composés aromatiques						
Thymol	1310	1289		27,2 ± 0,5	21,8	21,0
Carvacrol	1316	1298			0,9	1,0
Total identifié			87,0 ± 0,7	86,7 ± 1,1	93,6	90,2

[a]IR sont les indices de rétention déterminés avec la colonne Elite-5 MS en GC-FID en utilisant une série de *n*-alcanes.
[b]IRT Indices de rétention théoriques obtenus avec une colonne DB5, équivalente à celle utilisée (Adams, 2007)
[c] Les pourcentages relatifs présentés pour ces quatre huiles ont été obtenus en CPG-FID avec une colonne Elite 5MS. Les pourcentages relatifs présentés avec un écart type pour les huiles essentielles de Romarin et de Thym correspondent à la moyenne de ceux obtenus pour chacun des trois lots d'huiles essentielles obtenus avec la méthode de distillation de Farmaverde. Initialement, chacun d'entre eux a été analysé deux fois en CPG-FID et les moyennes respectives ont aussi été calculées de même que pour les huiles essentielles correspondantes aux 3 co-distillations.

Les analyses chimiques des espaces de tête des hydrolats ont été réalisées en utilisant la technique « Head Space solid-Phase Microextraction » (HS-SPME) et la CPG-SM dans les conditions décrites dans le chapitre 2 (Tableau 13). Compte tenu du fait que les co-distillations n'ont été réalisées qu'une seule fois, les résultats ne sont présentés qu'à titre informatif. Les variations des teneurs en thymol dans les espaces de tête des hydrolats issus des 3 co-distillations sont plus importantes en comparaison avec celles observées dans les huiles essentielles.

Aucune trace moléculaire supérieure à 1% correspondant à l'huile essentielle de Souci n'a été observée. Le cadinol, molécule caractéristique de cette plante ayant un indice de rétention théorique de 1652, n'a pas été observé bien que la programmation de l'analyse permettait de le voir. En outre, la distillation par entrainement à la vapeur des fleurs de cette plante n'a pas permis d'obtenir d'huile essentielle non plus.

Les HE obtenues lors des co-distillations 3PD1 et 3PD2 présentent, comme on pouvait s'y attendre, des proportions de molécules différentes par rapport aux HE seules comme l'illustre la Figure 17. On obtient des huiles essentielles présentant une diversité moléculaire à l'image des huiles de chaque plante isolée excepté celles du Souci. En effet, les chromatogrammes des HE 3PD1 et 3PD2 conservent en proportions différentes, les molécules principales de l'HE de Romarin telles que l' α-Pinène, le camphène, β-Pinène, 1,8 cinéol et camphre aux temps de rétention respectifs : 6,89 ; 7,63 ; 8,37 ; 10,37 et 17,23 et celles de l'HE de Thym telles que le *γ*–terpinène, le *p*-cymène et le thymol, aux temps de rétention 11,10 ; 11,74 ; et 28,92. Cette diversité moléculaire est très intéressante non seulement du point de vue de l'activité biologique antimicrobienne, mais aussi en terme de sécurité et de parfums des hydrolats et huiles essentielles obtenues. La comparaison des chromatogrammes des hydrolats de Thym et de Romarin avec celui de l'hydrolat obtenu lors de la co-distillation des deux plantes illustre cette diversité (Figure 18).

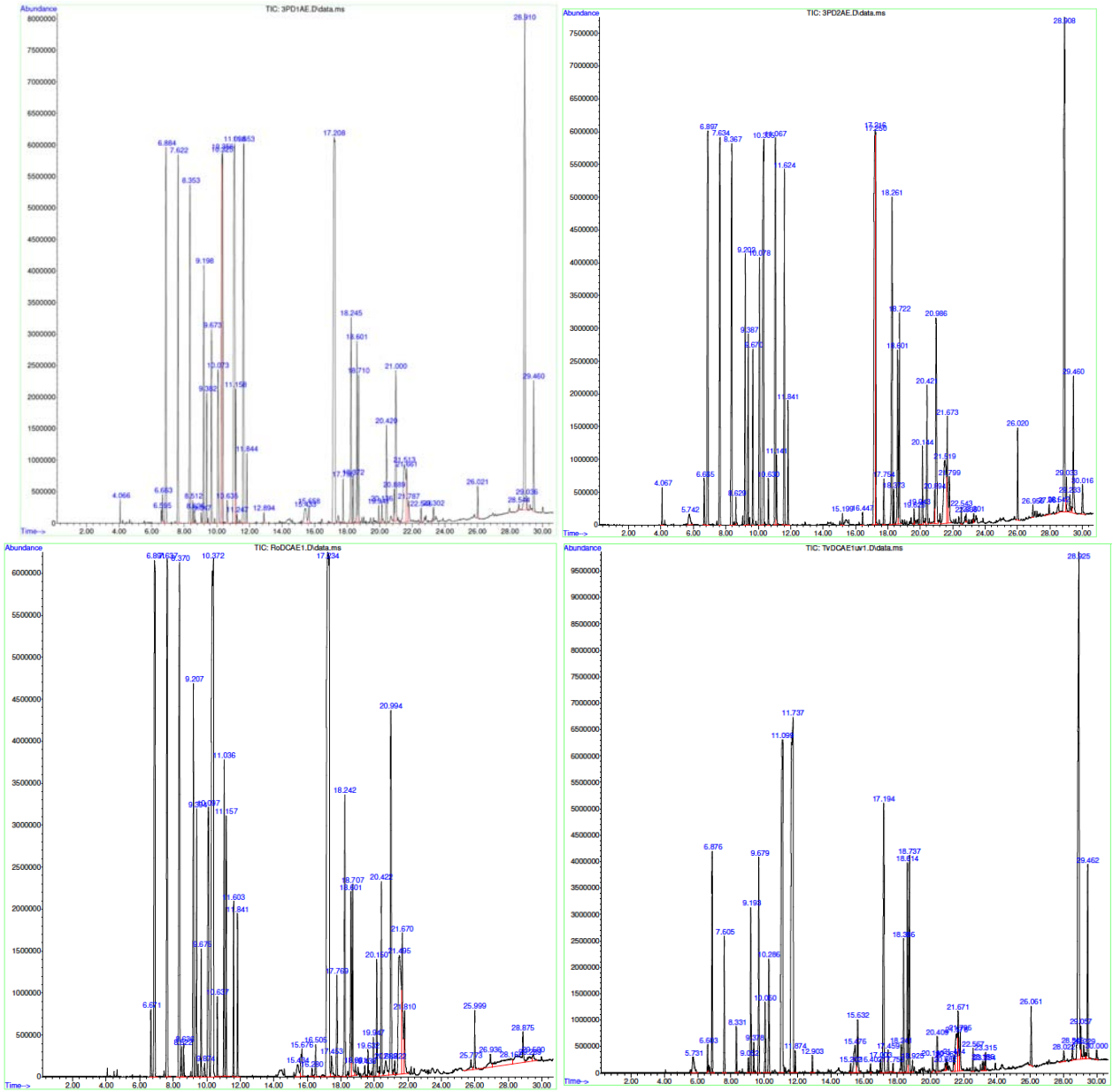


Figure 17. Profils chromatographiques des HE 3PD1, 3PD2 (en haut) et Ro et Tv (en bas)

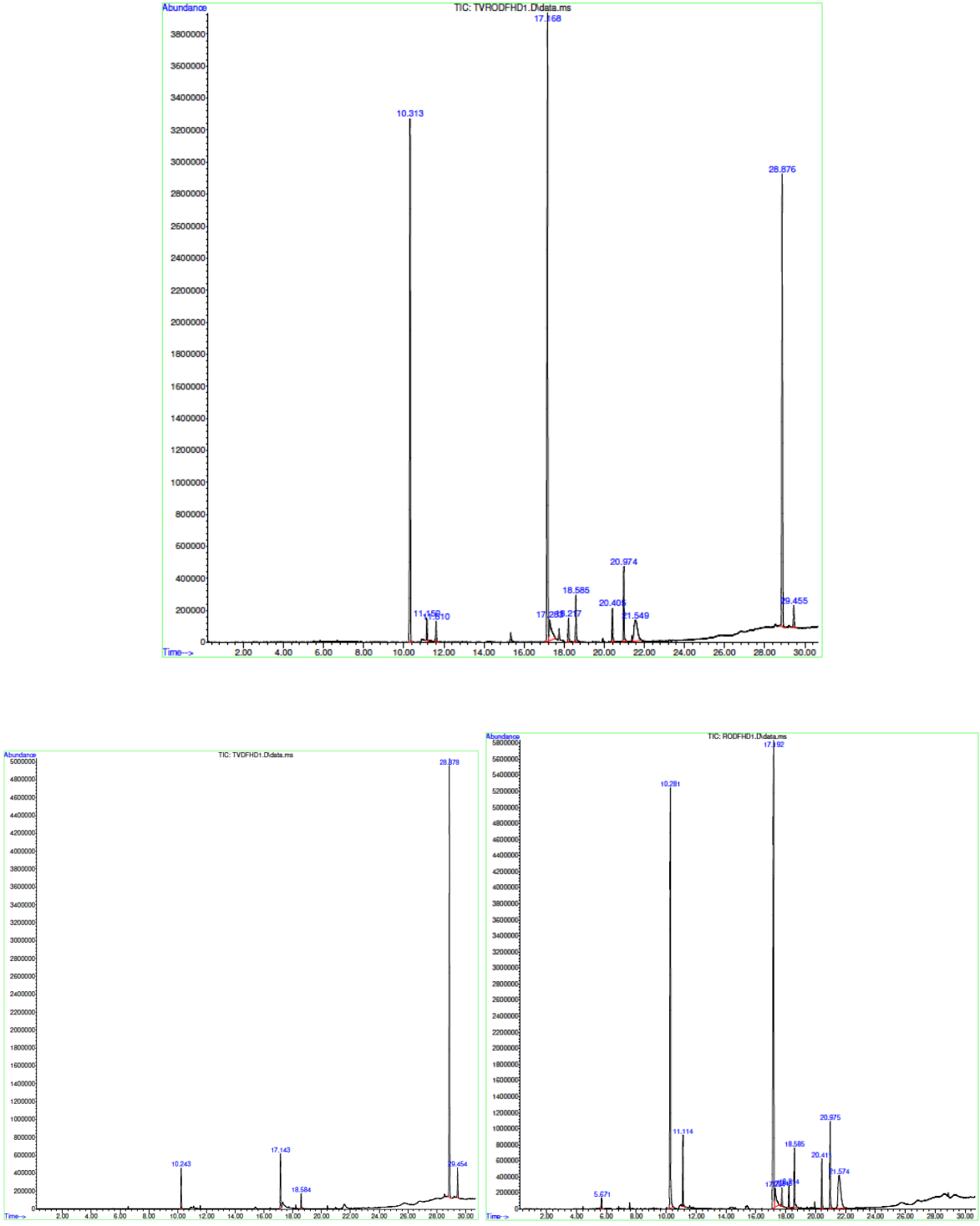


Figure 18. Profils chromatographiques des hydrolats de Romarin de Thym et des deux plantes co-distillées, obtenus par l'analyse HS-SPME-CPG-SM en utilisant une colonne INNOWAX.

Tableau 13. Compositions des hydrolats obtenus par les co-distillations 3PD1, 3PD2 et TvRo comparées à celles des hydrolats de Romarin (RoFHD1) et Thym (TvFHD1)(%)

Composés	IR[a]	IRT[b]	RoFHD[c]	TvFHD[c]	3PD1 HD[c]	3PD2 HD[c]	TvRo HD[c]
Monoterpène hydrocarboné							
p-Cymène	1290	1282				1,2	0,8
Monoterpènes oxygénés							
1.8-Cinéol	1226	1214	29,6 ± 1,8	4,3 ± 0,7	14,1	32,5	24,6
Linalol	1554	1570					
Camphre	1555	1532	38,5 ± 2,4	8,0 ± 1,3	28,5	37,1	36,7
Terpinèn-4-ol	1637	1616	3,0 ± 0,4	1,7 ± 0,1	2,6	3,1	2,0
Verbénone	1813	1733	4,3 ± 0,8		3,0	3,7	3,5
Bornyl acétate	1608	1580	1,5 ± 0,5		2,9	1,9	1,0
α-Terpinéol	1824	1720	2,3 ± 0,3		2,0	2,0	1,6
Bornéol	1879	1642	6,1 ± 1,2			5,5	4,6
Cétones aliphatiques							
3-Octanone	1267	nd	3,2 ± 0,2				
Composés aromatiques							
Thymol	2408	nd		71,9 ± 0,7	42,3	10,9	23,2
Carvacrol	2440	nd		4,7 ± 0,4	1,9		1,1
Total identifié			88,5 ± 5,7	90,5 ± 2,4	97,2	97,8	99,2

[a]IR sont les indices de rétention déterminés avec la colonne HP-INNOWAX, en utilisant une série de *n*-alcanes.
[b]IRT Indices de rétention théoriques obtenus avec une colonne DB-WAX, équivalente à celle utilisée, référencés dans la base de données pherobase.
[c]Les pourcentages relatifs présentés pour ces hydrolats ont été obtenus en CPG-SM avec une colonne INNOWAX. Les pourcentages relatifs présentés avec un écart type pour les hydrolats de Romarin et de Thym correspondent à la moyenne de ceux obtenus pour chacun des trois lots d'hydrolats obtenus avec la méthode de distillation de Farmaverde.

Conclusion

La méthode de distillation par entrainement à la vapeur utilisant comme source de vapeur un macérât de feuilles et fleurs de Romarin n'a pas d'impact particulier sur la composition chimique des huiles essentielles et des hydrolats comparés à celle obtenue avec la méthode de distillation conventionnelle.

Par contre une différence a été observée dans le cas du Thym. En effet, cette espèce cultivée dans les mêmes conditions que le Romarin, présente spécifiquement une différence dans la teneur relative des deux composés majoritaires que sont le thymol et le *p*-cymène. Le ratio de ces molécule s'inverse lorsqu'on utilise le macérât pour la distillation. Le thymol majoritaire devant le p-cymène dans l'HE obtenue par le procédé de distillation conventionnelle se retrouve en quantité moindre que le p-cymène, dans l'HE obtenue par distillation du macérât, qui devient alors à son tour le composé majoritaire. Cette différence pourrait être due au fait que l'oxydation du p-cymène en thymol ait été plus importante en appliquant la méthode conventionnelle qu'avec la méthode adaptée.

Les profils analytiques des huiles essentielles et des hydrolats obtenus par les combinaisons de co-distillation du Thym, Romarin et Souci (*Calendula officinalis*) démontrent que la combinaison des plantes peut amener à des extraits dont la diversité chimique peut être quantitativement modulée. .

Dans le chapitre 3, les activités antioxydante et antimicrobienne seront évaluées sur les extraits d'huiles essentielles et d'hydrolats, obtenus dans ce chapitre 2, seuls ou en combinaison.

L'étude des co-distillations ainsi que l'analyse chimique et l'évaluation de l'activité biologique des HE et HD obtenus par co-distillation, constituait l'étude principale de cette thèse initialement. Cependant, j'ai décidé de ne pas la poursuivre car il m'a semblé être plus important de définir et justifier plutôt, les proportions de matériel végétal qui pourraient postérieurement être utilisées en co-distillation.

La composition chimique des huiles essentielles et hydrolats obtenus dans le cas de la co-distillation est semblable à celle du mélange de ces extraits. La

formulation de mélanges de proportions contrôlées d'huiles essentielles ou d'hydrolats permet l'obtention d'une diversité moléculaire dont les différents pourcentages seront diminués en raison de la dilution impliquée par le mélange. Ceci implique d'une part la diminution des risques de toxicité de molécules au-delà de certaines concentrations et d'autre part, l'amélioration de l'activité antimicrobienne et la diminution des risques de résistance des microorganismes face à cette diversité de métabolites secondaires.

De même, ces combinaisons pourront aussi avoir une activité additive proche de la synergie sur l'activité antioxydante comme on le verra dans le chapitre 3.

D'un point de vue thérapeutique, l'intérêt de ces mélanges réside dans la formulation de remèdes médicinaux conçus de manière intégrale non seulement pour calmer les symptômes d'une maladie ou affection (par exemple: inflammation, douleur), mais aussi accompagner l'organisme à affronter cette dernière (par exemple: hépatoprotection ou immunostimulation).

D'un point de vue olfactif, ces co-distillations impliquent la modification et l'atténuement des notes caractéristiques de chaque huile essentielle – notes de tête, cœur et fond – vers une nouvelle identité olfactive dérivée du mélange aromatique.

Compte tenu des observations antérieures, les activités biologiques des HE et HD non combinés et des combinaisons d'HE et d'HD ont été évaluées de manière à ajuster correctement les proportions des HE et HD dans les combinaisons en prenant en considération les résultats d'activité biologique obtenus pour chacun d'entre eux non combiné. Ces proportions une fois vérifiées dans les combinaisons, pourront être postérieurement prises en considération au moment de réaliser les co-distillations.

CHAPITRE 3 – CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES, HYDROLATS ET DE LEURS COMBINAISONS

Introduction

Dans ce dernier chapitre, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et hydrolats de Thym et Romarin obtenus selon les deux modes de distillation et ceux de Pronto Alivio (*Lippia alba*) est évaluée contre les bactéries *Escherichia coli* (Gram-), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-), *Staphylococcus aureus* (Gram+) et les levures *Candida albicans* et *Aspergillus niger.*

Compte tenu de l'intérêt d'objectiver un effet conservateur pour des produits phytothérapeutiques, seules les concentrations minimales bactéricides (CMB) et fongicides (CMF) ont été évaluées. De même, la concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) antiradicalaire des huiles essentielles et hydrolats a été évaluée par la méthode ABTS. Les gammes de concentrations correspondantes aux différentes valeurs obtenues (CMB, CMF et CI_{50}) précédemment ont ensuite été appliquées pour tester les combinaisons des différentes huiles essentielles et hydrolats en combinaisons. La définition du type d'interaction a ensuite été recherchée en utilisant les équations et paramètres présentés en ce début de chapitre et les résultats obtenus ont été discutés.

1. Matériel et méthodes

1.1. Étude des interactions

L'évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne des combinaisons d'HE entre elles et d'HE avec les HD a été réalisée en utilisant les mêmes gammes de concentration que celles des extraits isolés pour la définition de leur IC_{50} respective avec l'ABTS et leur concentration minimale bactéricide et fongicide contre les différentes souches testées. Ces résultats sont présentés dans les sous-chapitres suivants. L'analyse de l'interaction des extraits en combinaison sur l'activité antimicrobienne a été effectuée en calculant les indices de Concentration Fractionnaire Bactéricide (CFB ou FBC en anglais) et de Concentration Fractionnaire Fongicide (CFF) reportés par Gutierrez *et al.*(2008a) et (EUCAST, 2000) avec quelques modifications en utilisant les équations suivantes pour chacune des activités microbicides:

$CFB = CFB_A + CFB_B$, où

CFB_A = (CMB_A combiné) / (CMB_A non combiné)

CFB_B = (CMB_B combiné) / (CMB_B non combiné)

Où « CMB_A combiné » est la Concentration Minimale Bactéricide de l'extrait A lorsqu'il est combiné avec l'extrait B et « CMB_A non combiné » est la Concentration Minimale Bactéricide de l'extrait A lorsqu'il est seul. De même, « CMB_B combiné » est la Concentration Minimale Bactéricide de l'extrait B lorsqu'il est combiné avec l'extrait A et « CMB_B non combiné » est la Concentration Minimale Bactéricide de l'extrait B lorsqu'il est seul.

Et $CFF = CFF_A + CFF_B$, où

CFF_A = (CMF_A combiné) / (CMF_A non combiné)

CFF_B = (CMF_B combiné) / (CMF_B non combiné)

Dans ces deux dernières équations, les codes utilisés ont la même signification que ceux définis précédemment à la seule différence que le « B » de Bactéricide est remplacé par le « F » de Fongicide.

La formule de la concentration fractionnaire inhibitrice n'a jusqu'à présent pas été adaptée à l'activité antioxydante de combinaisons d'extraits afin de mettre en évidence le type d'interaction entre les extraits ou molécules étudiées. C'est ce que j'ai fait dans le cadre de cette thèse en adaptant à l'activité antioxydante de combinaisons d'extraits, la notion de Concentration Fractionnaire Antioxydante laquelle est définie par l'équation suivante :

$CFA = CFA_A + CFA_B$, où

CFA_A = (IC_{50A} combiné) / (IC_{50A} non combiné)

CFA_B = (IC_{50B} combiné) / (IC_{50B} non combiné)

Où CFA_A est la Concentration Fractionnaire Antioxydante de A calculée en divisant la IC_{50} de A combiné avec B par la IC_{50} de A seul.

Le type d'interaction entre les extraits en combinaisons a été interprété en considérant les recommandations de l'EUCAST (2000) de la manière suivante pour les Concentrations fractionnaires (CF) bactéricide, fongicide ou antioxydante :

CF≤0.5: Synergie (S); 0.5<CF≤1: Addition (A); 1<CF<2 Indifférence (I); CF≥2: Antagonisme (Ag).

1.2. Activité antiradicalaire sur le DPPH

L'évaluation préliminaire de l'activité antioxydante des échantillons a été réalisée en utilisant la méthode du radical stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), méthode initialement développée par Blois (1958) et adaptée par Brand-Williams *et al.* (1995) aux substances naturelles. Le DPPH, de couleur violette en solution, présente un maximum d'absorption à 515 nm. Une fois réduit sa couleur caractéristique violette disparait et devient jaune.

La solution de DPPH a été préparée de la manière suivante : 10 mg de DPPH sont dilués dans 10 mL d'éthanol analytique, solution mère, laissée 45 minutes dans l'obscurité. 2 mL de cette solution sont de nouveau dilués dans 10 mL d'éthanol afin d'obtenir une absorbance approximative de 0.75 à 520 nm. 10 µL de chaque concentration d'échantillon dilué dans l'éthanol sont ajoutés à 240 µL de solution éthanolique de DPPH. Les mesures d'absorbance sont réalisées dans des microplaques de 96 puits en utilisant un fluoromètre Fluo Star Optima à 520 nm (BMG LABTECH, Allemagne).

Lors des premiers essais, une interaction a été observée entre les HE de Thym et Romarin et le matériel des microplaques à partir d'une concentration de 2000 ppm, ce qui affectait les résultats d'absorbance, par conséquent j'ai travaillé avec des gammes de concentrations inférieures mais suffisantes pour obtenir des pourcentages d'inhibition compris entre 20 et 90% tout en assurant une réponse linéaire du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations utilisées.

Initialement, différentes concentrations de l'échantillon ont été évaluées afin de définir la gamme de concentrations permettant de mettre en évidence la concentration requise de l'échantillon pour diminuer celle du radical DPPH de 50% (CI_{50}). Cette valeur est aussi appelée concentration efficace EC_{50} et le temps nécessaire pour y parvenir est appelé T_{EC50} (Sánchez-Moreno *et al.* 1998). Ensuite, des gammes de 6 dilutions encadrant la valeur approximative

de la CI_{50} sont préparées en série pour chacun des échantillons de la manière suivante:

- 10 µL de chaque échantillon aux différentes concentrations sont ajoutés à 240 µL de DPPH.
- Les mesures d'absorbance sont réalisées à 520 nm.
- Le Trolox (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique), analogue hydrosoluble de l' α-tocophérol est utilisé comme contrôle positif et 250 µL de solution de DPPH comme contrôle négatif.

Ces essais ont été réalisés à trois moments différents en triplicat pendant les mois de novembre et décembre 2013. La CI_{50} est calculée au temps t correspondant au début de la phase stationnaire ou « plateau » de la courbe représentant l'évolution de l'inhibition en fonction du temps. Dans le cas des échantillons testés, ce temps est de 185 minutes. Initialement plusieurs essais ont été effectués en évaluant les CI_{50} à différents temps afin de mettre en évidence la phase stationnaire ; temps opportun pour calculer la CI50 de chaque extrait (Figure 19 et Figure 20). Une différence très importante est observée entre la CI50 calculée après 30 minutes (720 µL/L) et celles obtenues à 120 minutes (342 µL/L). Dans le cas de l'huile essentielle de Thym on peut objecter à cette définition que si le même temps est considéré pour comparer différents échantillons, la proportionnalité est gardée. Cependant ce n'est pas le cas lorsque l'on compare des extraits végétaux ayant des cinétiques réactionnelles différentes sur le radical libre comme nous pourrons l'observer directement dans les résultats obtenus avec l'ABTS.

Le pourcentage de disparition du radical libre, aussi exprimé comme pourcentage d'inhibition (PI) est calculé de la manière suivante:

$$PI = (D_0 - D_t) / D_0) \times 100$$

Où D_0 est l'absorbance de la solution de DPPH sans antioxydant et D_t est l'absorbance de la solution de DPPH avec l'antioxydant au temps t.

Une régression linéaire est finalement effectuée au temps t=185 min exprimant la relation entre le pourcentage d'inhibition et la concentration de l'antioxydant, selon une équation de type y=ax+b qui permet de calculer la CI_{50} en remplaçant « y » (concentration inhibitrice) par 50.

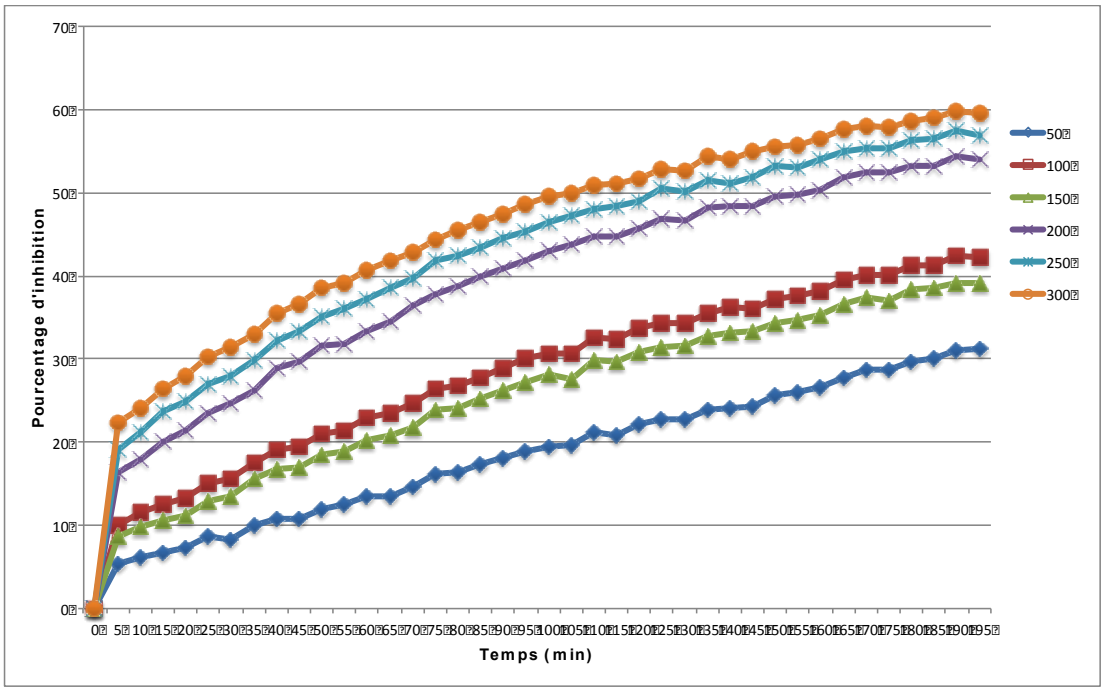


Figure 19. Pourcentage d'inhibition de l'HE de Thym TvDCHE2 sur DPPH en fonction du temps à différentes concentrations (µL/L)

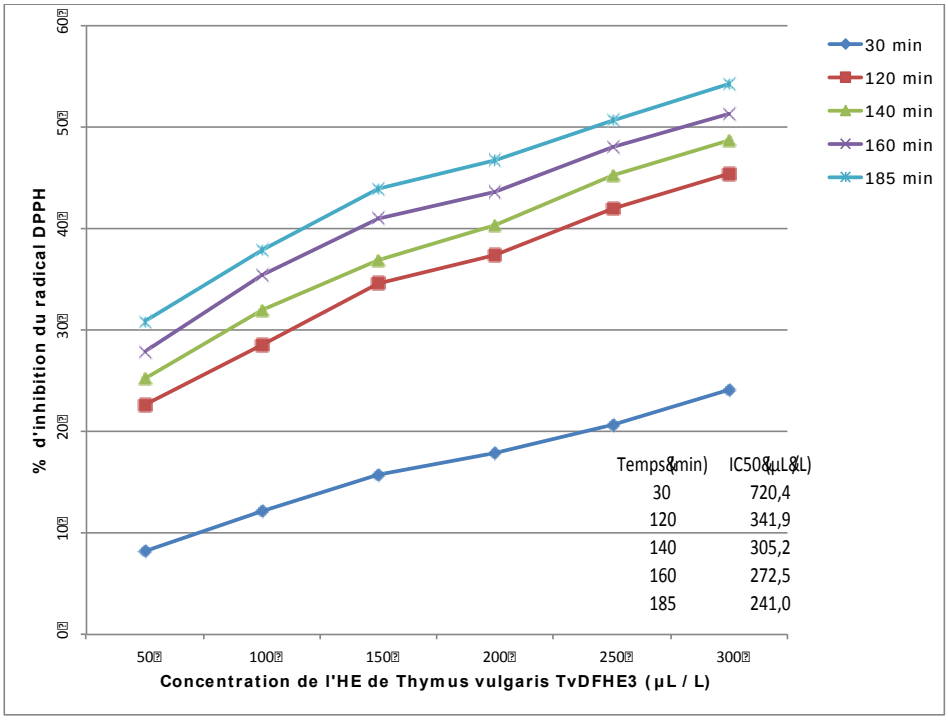


Figure 20. Cinétique réactionnelle de l'HE de Thym vulgaris TvDFHE3 sur le radical DPPH en fonction du temps

1.3. Activité antiradicalaire sur l'ABTS

La méthode appliquée est une adaptation de celle présentée par Re *et al.* (1999) dans laquelle le radical utilisé est l'acide 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic (ABTS), obtenu de Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

De même que pour la méthode DPPH, le fluoromètre Fluor Star Optima est utilisé. La méthode ABTS utilisée est une adaptation de celle de Miller et *al.* (1993). La solution mère d'ABTS doit être préparée approximativement 16 heures avant l'expérience de manière à obtenir un radical stable ; 20 mg d'ABTS et 2,5 mg de persulfate de potassium (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) sont dilués dans 10 mL d'eau déionisée et laissés à température ambiante pendant 16 heures. Par la suite, cette solution est de nouveau diluée dans l'eau déionisée pour obtenir une solution d'ABTS ayant une absorbance d'environ 0,73 à 740 nm, soit approximativement 500 µL de solution préparée pour 10 mL d'eau déionisée et conservée à 4ºC.

Initialement pour chacun des échantillons, six dilutions en série ont été réalisées en triplicat afin de mettre en évidence une gamme de quatre concentrations qui encadrent la concentration requise de l'échantillon pour diminuer celle du radical ABTS de 50% (CI_{50}). Ceci permet d'évaluer une gamme de chaque échantillon en triplicat sur une seule ligne de microplaque, et par conséquent de travailler avec 8 échantillons différents avec chaque microplaque. Ces essais ont été réalisés trois fois en triplicat.

Les gammes de 4 dilutions encadrant la valeur approximative de la CI_{50} sont préparées en série pour chacun des échantillons de la manière suivante :

- 10 µL de chaque échantillon aux différentes concentrations sont ajoutés à 240 µL d'ABTS.
- Les mesures d'absorbance sont réalisées à 740 nm.

Le Trolox (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique), analogue hydrosoluble de l' α-tocophérol est utilisé comme contrôle positif et la solution d'ABTS comme contrôle négatif.

De même que pour la méthode DPPH précédente, la CI_{50} est calculée au temps t correspondant au début de la phase stationnaire ou « plateau » de la courbe

représentant l'évolution de l'inhibition en fonction du temps. Dans le cas des échantillons testés avec l'ABTS, les lectures ont été réalisées pendant 120 minutes compte tenu du temps de réaction des HE de Pronto Alivio et Romarin pour atteindre cette phase stationnaire (Figure 21). Il est intéressant d'observer que la cinétique réactionnelle de l'hydrolat de Thym suit celle de l'huile essentielle durant les premières cinq minutes.

Les gammes de quatre concentrations suivantes ont été définies respectivement pour le Thym, Romarin et Pronto Alivio : 0.75 à 6 µL/L ; 500 à 3000 µL/L et 20 à 160 µL/L. Ces gammes de quatre concentrations ont été définies initialement dans une gamme de six concentrations laquelle a été réduite à quatre ensuite. Ces quatre concentrations ont aussi été utilisées au moment d'évaluer l'activité antioxydante des combinaisons. Dans le cas des hydrolats, les concentrations utilisées étaient entre 1 500 et 40 000 µL/L. Cette dernière était la plus élevée qui pouvait être utilisée.

Le pourcentage de disparition du radical libre, aussi exprimé comme pourcentage d'inhibition (PI) est calculé de la manière suivante :

$$PI = (A_0 - A_t) / A_0) \times 100$$

Où A_0 est l'absorbance de la solution d'ABTS sans antioxydant et A_t est l'absorbance de la solution d'ABTS avec l'antioxydant au temps t.

Une régression linéaire est ensuite effectuée au temps t=120 min – équivalent au début de la phase stationnaire (Figure 21)- exprimant la relation entre le pourcentage d'inhibition, lui-même dérivé de l'absorbance et la concentration de l'antioxydant, selon une équation de type y=ax+b qui permet de calculer la CI_{50} en remplaçant y par 50.

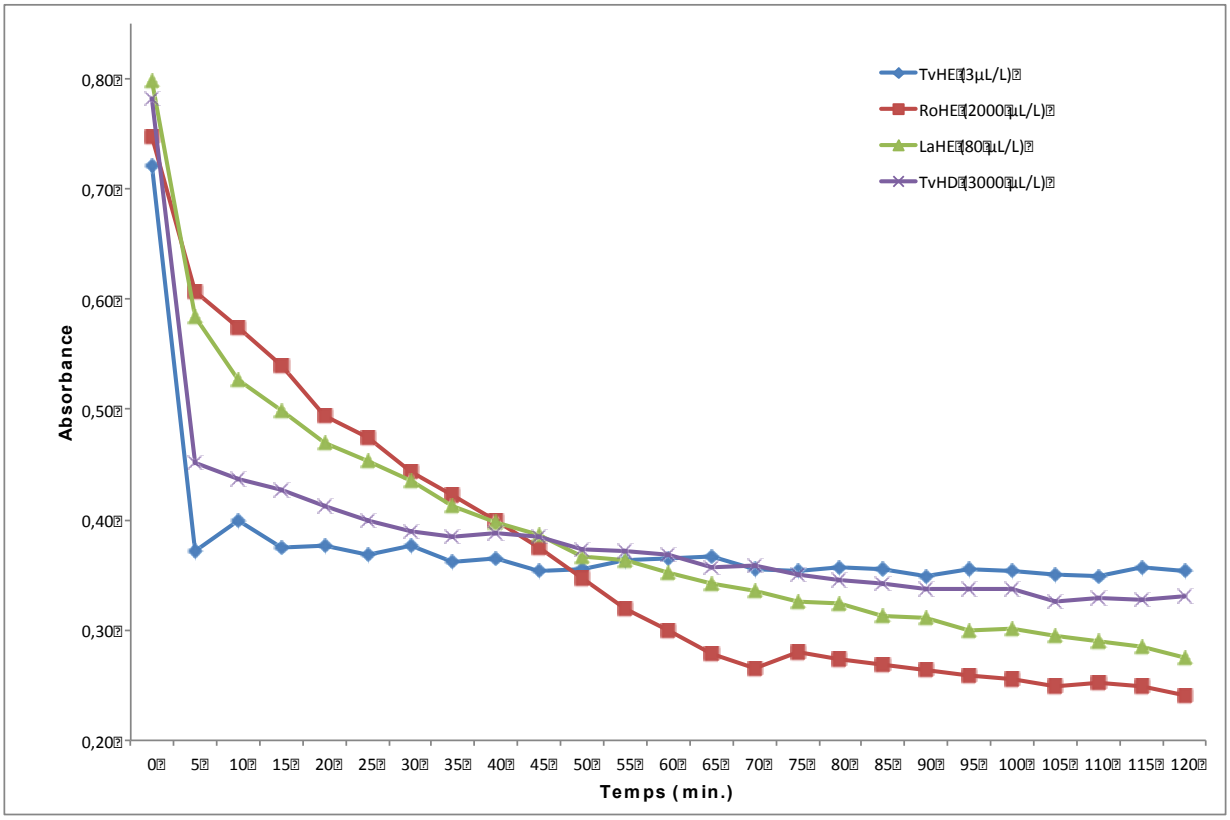


Figure 21. Cinétique de la réaction antiradicalaire des HE de Pronto Alivio, Romarin et Thym et de l'hydrolat de Thym sur l'ABTS.

L'évaluation de l'activité antioxydante des combinaisons HE-HE et HETv-HDTv a été réalisée en utilisant les gammes de concentration avec lesquelles l'activité antioxydante des extraits isolés a été mesurée pour définir leur IC_{50}. C'est-à-dire, de 0.75 à 6 ppm pour l'HE de Tv et de 375 à 3000 ppm pour les hydrolats de la même espèce végétale.

L'un des avantages de l'ABTS en comparaison avec le DPPH est que l'ABTS peut être solubilisé en milieu aqueux ou organique. Par conséquent, l'activité antioxydante de l'échantillon étudié pourra donc être due à des molécules hydrophiles ou lipophiles (Arnao, 2001).

Les différences de résultats de CI_{50} obtenus avec le DPPH et l'ABTS traduisent la sensibilité des deux méthodes non seulement avec les huiles essentielles de Thym pour lesquelles les CI_{50} sont presque 100 fois plus élevées avec la méthode DPPH mais aussi avec les hydrolats de cette plante avec lesquels aucune réaction de piégeage du DPPH n'a été observé jusqu'à 40 000 µL/L.

Cependant, ces hydrolats ont présenté des CI_{50} de l'ordre de 3 000 µL/L avec l'ABTS.

Le temps requis pour atteindre l' IC_{50} est T_{IC50}. Dépendamment de la valeur de ce temps, l'antioxydant sera qualifié de rapide (<5 min.), intermédiaire (5< T_{IC50}<30 min.) ou lent (>30 min.) selon Sánchez-Moreno *et al.*, (1998) qui ont défini la notion d'efficacité anti radicalaire laquelle constitue un paramètre permettant d'exprimer la capacité antioxydante en mettant en relation non seulement la valeur de l'IC_{50}, mais aussi le temps requis pour atteindre cette valeur.

1.4. Activité antimicrobienne

1.4.1. Microorganismes

La méthode de dilution en micro plaque a été utilisée pour évaluer la concentration microbicide des HE et HD contre *Escherichia coli* (Gram-), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-), *Staphylococcus aureus* (Gram+) et *Candida albicans*. Elle correspond à une adaptation de celle décrite par Medina *et al.* (2012) en utilisant le lecteur d'absorbance BIOSCREEN C Microbiological Growth Analyser (Labsystems, Helsinki, Finland) (Photo 5) qui permet la mesure de turbidité des solutions microbiennes dans 200 puits (2 plaques de 100 puits). Les mesures d'absorbance obtenues avec le BIOSCREEN reflètent la turbidité du milieu associée à la croissance cellulaire (Begot *et al.* 1996). Le protocole appliqué avec cette méthode est détaillé dans ce sous-chapitre de même que le protocole appliqué pour déterminer la concentration minimale fongicide contre *Aspergillus niger*, lequel constitue une adaptation de la méthode reportée par Hammer *et al.*(1999).



Photo 5. le BIOSCREEN C utilisé à l'université Javeriana (Bogota, COLOMBIE)

Les microorganismes sélectionnés dans le cadre de cette étude sont ceux recommandés par la pharmacopée européenne (L'Europe, 2002) pour l'évaluation de l'efficacité de la conservation antimicrobienne de produits pharmaceutiques; *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans et Aspergillus niger*.

- Escherichia coli

Escherichia coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae.* Bactérie Gram négatif non sporulées, mobile, elle possède une flagellation péritriche mais peut être non mobile. Elle mesure approximativement 3 µm de long et 0.5 µm de largeur. Mésophile (température optimale de croissance de 37°C), elle est oxydase négative et catalase positive. C'est une bactérie de croissance rapide qui est distribuée de manière étendue dans les sols, l'eau et une grande variété d'animaux. Elle est présente dans le tractus gastrointestinal où elle compose environ 80% de notre flore intestinale. Elle est généralement commensale, mais peut devenir pathogène et générer alors une gastro-entérite ou une infection urinaire entre autres pathologies (Edwards & Ewing, 1986).

- *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie mésophile Gram négatif aérobique qui appartient à la famille Pseudomonaceae. Elle mesure de 1,5 à 5 µm de long et à un diamètre de 0.5 à 1.0 µm. Dans certaines conditions, elle peut se développer lentement en conditions anaérobiques en utilisant le nitrate (NO_3) ou l'arginine comme accepteur final d'électrons. Cette bactérie possède un flagelle polaire. Elle est oxydase et catalase positive et se développe à un pH inférieur à 4.5. En milieu de développement optimum, *P. Aeruginosa* sécrète une variété de pigments comme la pyocianine (bleu vert) – d'où l'autre nom de cette bactérie: bacille pyocyanique ou bacille du pus bleu- la fluorescéine (jaune vert fluorescent) et la piorubine (rouge foncé). C'est un microorganisme commun dans l'environnement. Il vit dans les sols et milieux humides et fait parti des germes couramment recherchés dans les analyses d'eau. Chez l'homme, les infections de cette bactérie sont variées au niveau oculaire, gastro intestinal, pulmonaire ou du système urinaire (responsable de septicémies) (Ran *et al.* , 2003).

- *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, bactérie Gram positif appartient à la famille des Micrococcaceae. C'est une Cocci Gram positif de 0.5 à 1.5 µm de diamètre. Cette bactérie est catalase positive et oxydase négative. Elle est immobile, thermorésistante bien qu'elle soit mésophile (température optimale de croissance de 37°C), principalement aérobique et anaérobique de manière facultative son pH optimal est 7. *S. aureus* est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus* (Kenneth & Ray, 2004). Elle peut causer des infections mineures de la peau comme des impétigos ou des furoncles, mais aussi des pathologies beaucoup plus alarmantes comme la pneumonie, la méningite, l'ostéomyélite ou des septicémies.

- *Aspergillus niger*

Aspergillus niger est une levure filamenteuse noire. C'est une des espèces d'Aspergillus les plus connues que l'on observe sur les fruits et légumes. Elle

peut croitre en milieu particulièrement acide, jusqu'à un pH de 2 avec des températures optimales de croissance entre 11 et 42ºC (Pitt & Hocking 2009). Tout spécialement chez des patients immunodéficients, *A. Niger* peut provoquer une otite invasive pouvant engendrer la perte de l'audition et la mort du patient (Parize *et al.* 2009).

- Candida albicans

Candida albicans est l'espèce la plus connue de son genre. Cette levure asexuée appartient à la famille des *Saccharomycetaceae. C. Albicans* peut avoir différentes apparences; levure, pseudohyphe et hyphe dépendamment des conditions de température et de pH dans lesquelles elle se trouve (Nadeem *et al*., 2013) . Ses conditions optimales seront cependant caractérisées par un pH neutre et une température de 37ºC. Elle est présente naturellement dans les muqueuses de l'être humain dans la cavité orale, le tractus gastro-intestinal ou le vagin. C'est un organisme commensal saprophyte. Cependant elle peut provoquer une candidose chez des patients immunodéprimés pouvant causer leur décès.

1.4.2. Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne

1.4.2.1. Préparation des bactéries

Les bactéries *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sont conservées à -70°C en aliquotes de bouillon trypticase soja (TSB; Oxoid, Basingstoke, UK) avec 20% de glycérol. Pour leur activation, les bactéries sont décongelées à température ambiante, inoculées en bouillon trypticase soja et mises en incubation durant 24 heures à 37°C. Les isolements sont ensuite préparés en inoculant une goutte de la solution bactérienne sur agar-agar trypticase soja (TSA; Oxoid, Basingstoke, UK) dans une boite de Pétri, qui est ensuite incubée à 37°C pendant 24 heures.

1.4.2.2. Préparation des levures

Candida albicans CMPUJH022 est conservée à -70°C dans un bouillon d'extrait de malt avec 20% de glycerol (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Angleterre) et cultivé dans un extrait de malt à 37°C pendant 24 h pour obtenir des sous cultures qui seront ensuite inoculées sur agar Sabouraud (SA; Merck, Germany) à 37°C pendant 24h.

Aspergillus niger ATCC 16404 est cultivée sur agar Sabouraud pendant 5 jours à 25°C. Les conidiospores sont récupérées de ces cultures en utilisant 2 mL de solution saline stérile avec laquelle des aliquotes de 100 µL sont ensuite préparés. Pour obtenir des cultures monosporiques, 100 µL de solution de conidiospores sont semés massivement sur agar Sabouraud agar, et des disques de papier filtre de 5 mm sont placés sur l'agar et incubés à 25°C pendant 5 jours.

1.4.2.3. Préparation des huiles essentielles et hydrolats

Les différentes concentrations testées d'HE et d'HD sont préparées avec le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA), solvant polaire organique dilué dans l'eau distillée stérile. Cependant, les concentrations maximales de DMSO utilisables n'affectant pas la croissance des bactéries et levures ont d'abord été définies. Dans le cas de *S. aureus* et E. coli, le DMSO n'affectait pas la croissance des bactéries. Par contre, avec *C. albicans* et *P. aeruginosa*, les concentrations maximales utilisables étaient respectivement de 6 et 12%. Cette dissolution préliminaire dans le DMSO permet ensuite le mélange des HE dans le bouillon Muller Hinton (BMH - Bouillon Muller Hinton). Les solutions obtenues sont ensuite agitées au vortex pendant 20 secondes. 150 µL de chaque dilution est ajoutée à 150 µL de milieu inoculé dont la préparation est présentée ci-après.

1.4.2.4. Description des méthodes appliquées

- Méthode de Microdilution

La méthode de dilution en micro plaque utilisée, est une adaptation de celle décrite par (Medina *et al.* , 2012) en utilisant le lecteur BIOSCREEN C

Microbiological Growth Analyser (Labsystems, Helsinki, Finland), lequel permet la mesure de turbidité des solutions microbiennes dans 200 puits (2 plaques de 100 puits). Les mesures d'absorbance obtenues avec le BIOSCREEN reflètent la turbidité du milieu associée à la croissance cellulaire (Begot *et al.* 1996).

Cette méthode a été appliquée pour évaluer la concentration microbicide des HE et HD contre *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* et *Candida albicans.*

3 à 4 colonies de bactéries et levures (*C. albicans*) préparées selon le procédé décrit précédemment sont inoculées dans 5 mL de BMH puis incubées pendant 4 heures avant le montage de l'expérience. 2 mL de cette solution sont ensuite préparés en respectant le standard 0,5 de Mac Farland (Biomérieux Inc., Craponne, France) lequel équivaut à $1.5.10^8$ UFC/ml, pour être réparties dans la microplaque du BIOSCREEN en respectant les quantités suivantes pour chaque puit où l'expérience est menée: 1,5 µL d'inoculum + 148,5 µL de BMH – ce qui permet d'atteindre une concentration de $1.5.10^6$ CFU/ml - auxquels 150 µL de solution d'échantillon diluée dans le DMSO et le BMH sont ajoutées. Chacune des dilutions et contrôles positifs et négatifs (décrits ci-après) sont préparés en triplicat et chaque expérience est répétée au moins 3 fois.

L'absorbance est lue à 600 nm toutes les 2 heures, 5 secondes après une agitation à intensité moyenne de la plaque pendant 20 secondes pendant une durée totale de 22 heures à 37°C. 3 puits contenant 300 µL de BMH sont préparés en tant que contrôles négatifs, 3 puits avec 300 µL de BMH et d'inoculum correspondant aux contrôles de croissance de la bactérie, 3 autres puits de contrôle où l'inoculum est mélangé avec la concentration maximale de DMSO utilisée lors de chaque essai avec les HE afin de démontrer que ce solvant ne limite pas la croissance bactérienne à cette concentration et 3 puits de contrôle positif avec 150 µL de bactéries et 150 µL de Gentamicine préparée avec 5 disques (Marque Oxoid – Lot CT0024B) contenant chacun 10 µg (soit 50 µg) dans 500 µL de DMSO à 5% dans le cas de *E. coli* et *P. aeruginosa* et les mêmes quantités sont utilisées avec la Vancomycine pour *S. aureus* et l'amphotéricine B est utilisée à 1.25 µg/ml comme contrôle positif pour les essais contre *C. albicans*.

La vérification de la croissance ou non croissance bactérienne - observées par le biais de la mesure d'absorbance (ou mesure turbidimétrique) avec le BIOSCREEN – est réalisée selon deux procédés additionnels.

Le premier procédé est une méthode simple consistant à mettre en évidence la capacité des bactéries à croitre ou non après avoir été en contact avec les HE et HD. Cette méthode consiste à inoculer sur agar-agar pendant 24 heures à 37°C, 10 µL de l'un des 3 puits de chaque triplicat prélevés après la douzième lecture (t=22 heures).

Le second procédé est l'application de 10 µL de sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) avec la méthode de Mosmann (1983) dans chacun des puits puis l'incubation à 37°C pendant 30 minutes. L'anneau de tétrazolium sera réduit par la succinate déhydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives en formazan. Ce formazan forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. La quantité de ce précipité est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Pour faciliter cette lecture, on ajoute alors 75 µL de DMSO pur dans chaque puit afin de dissoudre les cellules et leurs contenus mitochondriaux (Photo 6). Une lecture d'absorbance à 540 nm est ensuite réalisée à t=0 et t=10 minutes afin de mettre en évidence l'absence ou présence d'activité métabolique bactérienne.

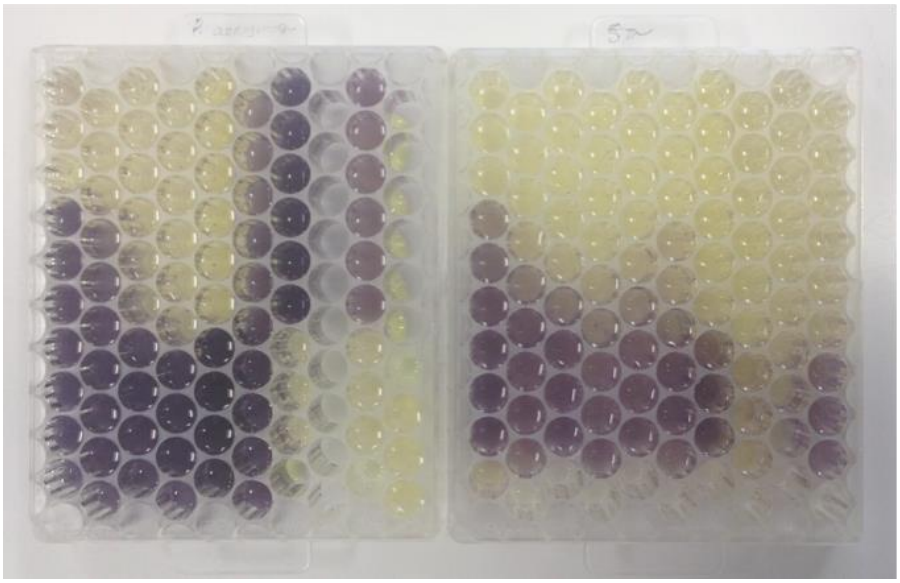


Photo 6. Résultats de l'essai 50 (27/08/2014) après application du sel de Tetrazolium et incubation de 30 min.

- Méthode de dilution

Compte tenu de la caractéristique filamenteuse de *Aspergillus niger*, l'évaluation fongicide des extraits contre cette levure n'a pas pu être évaluée avec le Bioscreen. La méthode de dilution en agar reportée par Hammer *et al.*(1999) a donc été adaptée avec quelques modifications.

Le milieu Potato dextrose agar (PDA) a été préparé dans des petites boites de Pétri avec différentes dilutions en série d'HE et d'HD préparées à environ 30ºC, température à laquelle le milieu est encore liquide et n'est pas trop élevé pour affecter la composition moléculaire des HE et HD. Un disque de papier filtre « envahi » au préalable par *A. niger* (voir sous chapitre « préparation des levures ») est déposé au centre du milieu gélosé dans la boite de Pétri puis incubé pendant 5 jours à 25°C.La Concentration Minimale Fongicide correspond à la concentration minimale à laquelle aucune croissance de la levure n'est observée. Chaque essai est répété à trois moments différents en triplicat. Trois contrôles négatifs sont préparés avec le PDA seul et trois contrôles positifs sont préparés avec le voriconazole à 10 µl/L.

Le résultat après cinq jours de l'un des essais avec l'HE de *Lippia alba* à 3 concentrations différentes (5000, 2500 et 1250 µL/mL) (de haut en bas) est présenté dans la Photo 7. Une activité positive de l'HE est observable jusqu'à 2500 µL/mL. Le contrôle négatif avec la levure *Aspergillus niger* est situé dans la rangée suivante, laquelle montre un développement de la levure. Enfin, le contrôle positif avec le voriconazole qui inhibe la croissance de la levure est dans la dernière rangée.

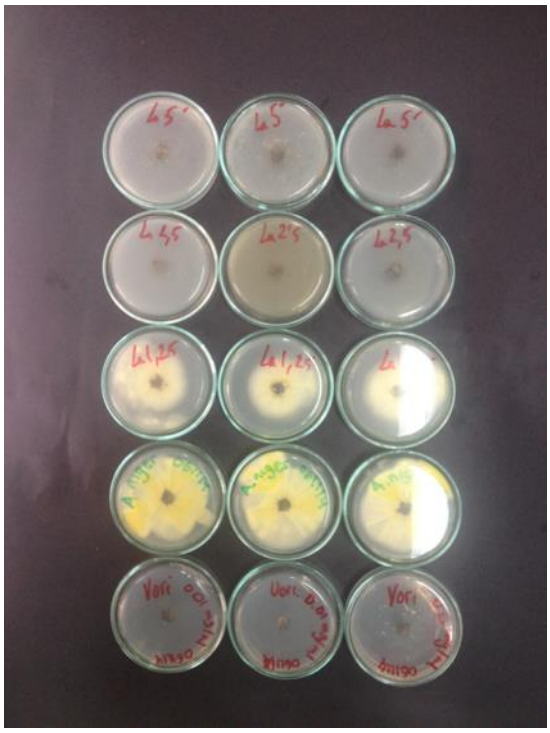


Photo 7. Résultats d'un essai de l'HE de Lippia alba contre Aspergillus niger.

2. Résultats et discussion

2.1. Activité antioxydante sur le DPPH

La méthode d'activité antiradicalaire sur le DPPH n'a été appliquée qu'avec les trois HE de *T. vulgaris* (Tv) obtenues avec la distillation par entrainement à la vapeur conventionnelle (DC) codifiée de TvDCHE1 à 3 et les 3 HE obtenues avec la Distillation adaptée par Farmaverde codifiées TvDFHE1 à 3. Avec cette méthode, les hydrolats de Thym testés, n'ont montré aucune activité antiradicalaire significative à une concentration maximale de 40000 µL/L. Les résultats d'CI_{50} obtenus aux temps t=30 minutes et t=185 minutes sont aussi présentés (annexe 1). Le temps t=30 minutes a été choisi à titre indicatif de manière à présenter la différence de résultats obtenus lorsque les calculs sont effectués bien avant la phase stationnaire à t=185 minutes.

Les moyennes des CI50, ainsi que les déviations standards et coefficient de variation pour les deux lots d'HE de *T. vulgaris* ainsi que celles du Trolox utilisé en tant que contrôle positif ont été calculées (Tableau 14).

Les lectures des IC_{50} aux temps 30 et 185 minutes impliquent des résultats de IC_{50} 0.37 fois moins importants à 185 minutes qu'à 30 minutes pour les deux

lots d'HE de T. vulgaris, alors que ce rapport n'est que de 0.83 avec le Trolox. Cette différence justifie dans le cas spécifique de cette huile essentielle, l'importance d'attendre la phase stationnaire de la réaction pour évaluer la CI_{50} réelle de l'échantillon étudié, tel que le recommandent Sánchez-Moreno *et al.* (1998). Ce sujet sera discuté en détail dans le sous-chapitre suivant (§2.2).

Tableau 14. Moyenne des CI_{50} des huiles essentielles de T. Vulgaris évaluées par la méthode DPPH

	CI_{50} (µL/L.) à T=30 mn			**CI_{50} (µL/L.) à T=185 mn**		
	30 mn	**Déviation standard**	**Coefficient de variation %**	**185 mn**	**Déviation standard**	**Coefficient de variation %**
TvDCHE1	456,5	47,5	10,4	171,3	8,7	5,1
TvDCHE2	503,0	202,8	40,3	202,8	18,0	8,9
TvDCHE3	562,6	206,5	36,7	206,5	16,3	7,9
TvDFHE1	556,1	209,6	37,7	209,6	16,9	8,1
TvDFHE2	673,6	242,4	36,0	242,4	28,7	11,8
TvDFHE3	683,7	238,9	34,9	238,9	17,1	7,2
Trolox[a]	217,9	9,5	4,4	180,4	9,7	5,4

2.2. Activité anti radicalaire sur l'ABTS des huiles essentielles et hydrolats obtenus selon deux méthodes de distillation

Dans le cas des résultats obtenus avec les deux groupes d'hydrolats de Thym, les résultats de CI_{50} observés ne présentent pas de différences notables (Tableau 15). Néanmoins, la CI_{50} de l'HE de Thym obtenue avec la méthode de distillation conventionnelle ; 2.9 µL/L est significativement inférieure à celle obtenue avec l'HE de Thym obtenue avec la méthode adaptée de distillation ; 3.9 µL/L. Cette différence pourrait s'expliquer en partie avec les différences de concentration de Thymol observées dans les deux groupes d'HE.

Dans le cas des HD de *R. officinalis* les CI_{50} n'ont pu être définies aux concentrations maximales que la méthode permettait d'utiliser : 40 000 µL/L. De même que pour les HE de Thym, les HE de Romarin obtenues avec la méthode conventionnelle de distillation ont présenté une meilleur CI_{50} que celles obtenues par la méthode adaptée. Cependant, à la différence des résultats de composition chimique obtenus pour les deux groupes d'HE de Thym, il n'y a pas dans le cas des deux groupes d'HE de Romarin de différences notables de composition chimique qui permettent d'expliquer ces différences de résultats de CI_{50} obtenus avec l'ABTS.

Tableau 15. Moyenne des CI_{50} avec l'ABTS des huiles essentielles et hydrolats de T. Vulgaris et R. officinalis obtenus avec deux méthodes de distillation.

	CI50 (µl/L)[a]				
	20 min	120 min		20 min	120 min
Huiles essentielles			**Hydrolats**		
TvDCHE1	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.3	TvDCHD1	3420.9 ± 73.9	3028.1 ± 118.8
TvDCHE2	3.5 ± 0.3	3.1 ± 0.2	TvDCHD2	3194.4 ± 215.6	2893.5 ± 181.2
TvDCHE3	2.9 ± 0.2	2.6 ± 0.2	TvDCHD3	3206.9 ± 177.7	2876.2 ± 173.1
Moyenne	**3.1 ± 0.3**	**2.9 ± 0.3**	**Moyenne**	**3274.1 ± 127.3**	**2932.6 ± 83.1**
TvDFHE1	4.2 ± 0.1	3.7 ± 0.1	TvDFHD1	3269.4 ± 198.5	2913.8 ± 191.2
TvDFHE2	4.8 ± 0.3	4.2 ± 0.5	TvDFHD2	3443.4 ± 183.0	3036.2 ± 200.7
TvDFHE3	4.3 ± 0.4	3.9 ± 0.3	TvDFHD3	3362.3 ± 224.4	3013.0 ± 192.0
Moyenne	**4.4 ± 0.3**	**3.9 ± 0.2**	**Moyenne**	**3358.4 ± 87**	**2987.7 ± 65.0**
RoDCHE1	3704.4 ± 251.3	1516.7 ± 54.5	RoDCHD1	>40000	>40000
RoDCHE2	4035.1 ± 237.3	1544.6 ± 189.2	RoDCHD2	>40000	>40000
RoDCHE3	4119.8 ± 153.1	1673.5 ± 82.0	RoDCHD3	>40000	>40000
Moyenne	**3953 ± 219.5**	**1578.3 ± 83.6**	**Moyenne**	>40000	>40000
RoDFHE1	5443.3 ± 153.0	2333.0 ± 41.0	RoDFHD1	>40000	>40000
RoDFHE2	5048.4 ± 216.2	2169.5 ± 143.7	RoDFHD2	>40000	>40000
RoDFHE3	5266.7 ± 600.7	2356.5 ± 108.0	RoDFHD3	>40000	>40000
Moyenne	**5252.8 ± 197.8**	**2286.3 ± 101.9**	**Moyenne**	>40000	>40000
Trolox	**8,8 +/- 0,7**	**8,3 +/- 0,8**			

2.3. Activité anti radicalaire sur l'ABTS des huiles essentielles et hydrolats non combinés et combinés

La CI_{50} de chaque extrait diminue lorsque qu'ils sont en combinaison de même que celles des HE de Thym et Romarin lorsque ces deux extraits sont en combinaison. Seul l'hydrolat de Thym a été utilisé dans les combinaisons avec l'HE de la même plante car c'est le seul qui a démontré la capacité de piéger le radical libre ABTS. Compte tenu du nombre limité d'échantillons, la normalité de la distribution a été testée par le test t de student. Les différences étaient significatives à $P<0.01$.

Selon les résultats obtenus, les HE de *L. alba* et *R. officinalis* sont des antioxydants lents. C'est le cas tout particulièrement de l'HE de *R. officinalis* dont les CI_{50} sont respectivement de 3704.3 et 1516.7 µL/L aux temps 20 et 120 minutes. De même, des variations importantes des déviations standards des CI_{50} ont été observées pour les deux HE aux temps 20 et 120 minutes ; 13.2 contre 2.5 pour *L. alba* et 251.33 contre 54.5 pour l'HE de *R. officinalis*.

Par contre, l'huile essentielle de *T. vulgaris* présente un comportement anti radicalaire rapide de même que le Trolox avec des CI_{50} respectives de 3.1 et 2.9 µL/L aux temps 20 et 120 minutes respectivement. C'est aussi le cas de l'hydrolat de la même plante tel que l'on a observé précédemment dans la Figure 21, dont la cinétique réactionnelle atteint aussi sa phase stationnaire en moins de 10 minutes. Ces résultats sont probablement dus à leur contenu respectif en thymol lequel constitue un antioxydant rapide. Les HE de Pronto Alivio et Romarin ont par contre des cinétiques réactionnelles différentes, ce qui implique qu'un temps minimum de 70 à 80 minutes soit nécessaire pour définir leur CI_{50} respectives. La CI_{50} de l'HE de Thym (3.1 ± 0.24 µL/L) est presque trois fois plus faible que celle du Trolox (8.8 ± 0.72 µL/L), ce qui peut être expliqué par sa concentration en thymol, molécule dont l'activité antioxydante est particulièrement importante ce qui justifie par ailleurs l'usage de l'HE de Thym à thymol en tant que standard pour évaluer les activités antioxydantes tel que le recommande Sacchetti *et al.* (2005).

Tableau 16. Efficacité des huiles essentielles et hydrolats pour piéger le radical libre ABTS (CI_{50})

	CI_{50} (µl/ L) [a]			
	20 min		**120 min**	
Huiles essentielles seules				
Pronto Alivio	110,4 ± 13,2		74,8 ± 2,5	
Romarin	3704,4 ± 251,3		1516,7 ± 54,4	
Thym	3,1 ± 0,2		2,9 ± 0,2	
Hydrolats seuls				
Pronto Alivio	>>40000		>>40000	
Romarin	>>40000		>>40000	
Thym	3420,9 ± 73,9		3028,1 ± 118,8	
Trolox	8,8 +/- 0,7		8,3 +/- 0,8	
Combinaisons (E1+E2) [b]	**E1**	**E2**	**E1**	**E2**
HE de Thym + HE de Pronto Alivio	1,8 +/- 0,04	48,9 +/- 1,1	1,4 +/- 0,05	36,6 +/- 1,2
HE de Thym + HE de Romarin	2,6 +/- 0,2	863,3 +/- 65,5	1,6 +/- 0,1	535,9 +/- 51,1
HE de Pronto Alivio + HE de Romarin	198,8 +/- 29,8	2484,8 +/-372,4	75,7 +/- 11,1	945,8 +/- 138,4
HE de Thym + HD de Thym	2,05 +/- 0,2	1027,4 +/- 102,4	1,6 +/- 0,1	1034,03 +/-145,9

La CI_{50} de l'hydrolat de Thym (3028.1 ± 118.78 µL/L) est similaire à celle obtenue par Aazza *et al.* , (2011) avec un hydrolat de Thym à Carvacrol., Les hydrolats de Romarin et de Pronto Alivio, quant à eux n'ont présenté aucune activité à 40000 µL/L ou en deçà de cette concentration maximale utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits étudiés. Des différences significatives ont été observées entre les activités antioxydantes des huiles essentielles de Thym obtenues par la méthode de distillation conventionnelle et ceux obtenus avec la méthode adaptée. Ces différences sont probablement dues au contenu en thymol des HE du premier lot avec des teneurs relatives entre 36.1 et 39.8%, lesquelles sont supérieures à celles du second lot (entre 26.7 et 27.6%).

Cependant, aucune différence n'a été observée entre les CI_{50} des HDs de Thym obtenues avec la méthode de distillation conventionnelle et les hydrolats obtenus avec la méthode adaptée par Farmaverde. Le groupe d'HD obtenu avec la méthode de distillation conventionnelle contient le p-cymène qui est absent dans le second. Ce dernier présente néanmoins des concentrations relatives variables mesurées dans l'espace de tête de 3.7 à 5.1% de 1.8-cinéol et de 7.1 à 9.4 de camphre alors que ces molécules n'apparaissent pas dans le premier groupe. Enfin, excepté dans le premier lot, le groupe d'HD obtenu avec la méthode conventionnelle présentait un pourcentage relatif de carvacrol plus important que les HD du second. Les CI_{50} obtenues avec les différents hydrolats de Thym sont similaires à ceux obtenus par Aazza *et al.* (2011): 3000 mg/mL à 6 minutes, avec un HD de Thym à carvacrol.

Pour les lots de Romarin, malgré le fait que les deux lots d'HE soient relativement similaires d'un point de vue chimique une différence importante de CI_{50} a été observée avec une moyenne de 1578 µl/L pour les 3 HE obtenues avec la méthode conventionnelle contre 2286 µl/L pour les HE obtenues avec la méthode adaptée. Cette différence pourrait s'expliquer par les faibles variations quantitatives des composés des HE entre les lots. Les Indices de Concentration Fractionnaire Antioxydante (ICFA) des combinaisons HE-HE et HE-HD antérieures ont été calculés (Tableau 17). De même que pour les extraits seuls, une différence importante est observée entre les Indices de

Concentration Fractionnaire Antioxydante (ICFA) aux temps 20 et 120 minutes pour la combinaison entre l'HE de Romarin et celle du Pronto Alivio laquelle présente une interaction d'antagonisme à 20 minutes et une indifférence à 120 minutes.

La valeur de CI_{50} de l'HE de *L. alba* non combinée est la seule qui n'a pas varié de manière significative lorsque cette HE était en combinaison avec celle de Romarin. Ce n'est par contre pas le cas de l'HE de Romarin dont la CI_{50} est passée de 1516 µL/L non combinée à 945 µL/L en combinaison avec cette HE.

Les valeurs de CI_{50} de l'HE de Tym ont diminué dans toutes les combinaisons. Non seulement avec les HE de Romarin et Pronto Alivio, mais aussi avec l'hydrolat de la même plante, combinaison qui a d'ailleurs présenté la meilleure valeur d'ICFA : 0.84 au temps t=120 minutes. L'interprétation de cette dernière valeur, significativement inférieure à 1 est variable dépendamment de l'index FIC utilisé. En effet, d'après les valeurs définies par (EUCAST, 2000) le type d'interaction est additif. Cependant, si on considère les valeurs proposées par l'équipe de Pei *et al.*, valeurs reportées par Bassolé et Juliani (2012) dans le tableau présenté dans le chapitre 1§1.6, il s'agirait alors d'une interaction de type synergique. De même, si la méthode graphique de l'isobolobramme était appliquée, l'interaction entre les deux extraits serait aussi de type synergique.

Tableau 17. Indices de Concentrations Fractionnaires Antioxydantes des combinaisons d'huiles essentielles et d'hydrolat

Combinaisons	ICFA 20	Int[a]	ICFA 120	Int[a]
HE Thym + HE Pronto Alivio	1.03	I	0.96	A
HE Thym + HE Romarin	1.07	I	0.91	A
HE Pronto Alivio + HE Romarin	2.45	AN	1.61	I
HE Thym + HD Thym	0.86	A	0.84	A

[a] Interaction: Les résultats sont interprétés de la manière suivante: Synergie (S, FMC≤0.5), Addition (A, 0.5<FMC≤1), Indifférence (I, 1<FMC<2) ou Antagonisme (AN, FMC≥2).

2.4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles et hydrolats obtenus selon deux méthodes de distillation

Pour chaque essai réalisé, les résultats de Concentrations Minimales Bactéricides des HE et HD isolés et des combinaisons contre *Escherichia coli* (CMB) présentés dans le tableau 18 sont déduits des trois valeurs suivantes; les pourcentages d'inhibition après 24 heures, les pourcentages de viabilité cellulaire suite au test du MTT et la croissance (O) ou non croissance (N) sur agar. Ces valeurs sont données en annexe 2 et 3. De même, Les résultats CMB pour *Pseudomonas aeruginosa*, et *Staphylococcus aureus* et CMF pour *Candida albicans sont issus des valeurs données en annexes 4 à 9*.

En ce qui concerne *Aspergillus niger*, Les gammes de concentrations utilisées pour chaque échantillon et les concentrations minimales fongicides (CMF en µl/L.) définies lors de chaque essai sont issues des données des Annexes 10 et 11. La moyenne des Concentrations Minimales Bactéricides et des Concentrations Minimales Fongicides des HE et HD de Thym et Romarin obtenus avec les deux méthodes de distillation a été calculée (Tableau 18). Les CMB et CMF des HE de Thym obtenues avec la méthode conventionnelle de distillation (DC) sont deux fois moins importantes que celles obtenues avec la méthode adaptée de distillation exceptée contre *C. albicans*. Ces différences de résultats peuvent être dues au contenu en Thymol plus important dans le premier groupe d'HE que dans le second. En effet, l'échantillon TvDCHE1 présente des pourcentages relatifs respectifs de thymol et p-cymène de 36.1% et 28.4% et l'échantillon TvDFHE1 des pourcentages respectifs de 27.3% et 37.7% pour ces deux molécules.

Les deux lots d'HE de Romarin présentent les mêmes résultats contre tous les microorganismes excepté contre *P. aeruginosa* contre laquelle les HE de Romarin obtenues avec la méthode adaptée présentent une CMB, deux fois moins importante que celle du premier lot (3.75 versus 7.5). Aucune différence significative dans la composition chimique des HE ne permet d'expliquer la différence entre ces derniers résultats. Aucun des HD de Romarin n'a présenté d'activité microbicide aux concentrations maximales testées. Cependant, tous les HD de Thym ont présenté des CMB et CMF de 250 µL/ml contre *P.*

aeruginosa, *S. aureus*, *C. albicans* et *A. niger.* Bien que ces valeurs de concentrations minimales bactéricides soient très élevées pour pouvoir considérer ces hydrolats comme des conservateurs potentiels, si ces derniers sont utilisés comme principes actifs majoritaires dans un produit thérapeutique, cette concentration en HD ou une concentration supérieure pourraient aussi permettre la conservation antimicrobienne du produit thérapeutique.

Tableau 18. CMB et CMF des HE et HD obtenues avec les deux méthodes de distillation.

	CMB (µL/ mL)			CMF (µL/ mL)	
	E. Coli	***P. Aeruginosa***	***S. Aureus***	***C. Albicans***	***A. Niger***
TvDCHE	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4
TvDFHE	0.8	0.8	0.4	0.2	0.8
RoDCHE	7.5	7.5	3.75	3.75	10
RoDFHE	7.5	3.75	3.75	3.75	10
RoDCHD	>500	>500	>500	>500	>250
RoDFHD	>500	>500	>500	>500	>250
TvDCHD	>500	250	250	250	250
TvDFHD	>500	250	250	250	250

2.5. Activité antimicrobienne des huiles essentielles et hydrolats non combinés et combinés

Les CMB et CMF des huiles essentielles et hydrolats testés non combinés et combinés sont présentées dans les tableaux 19 et 20 respectivement. L'hydrolat de Pronto Alivio, de même que celui du Romarin, n'a pas présenté d'activité microbicide aux concentrations testées. Seul l'hydrolat de Thym a présenté une activité microbicide avec des CMB et CMF de 250 µL/ml présentées ci –avant.

L'HE de Pronto Alivio était la seule HE qui n'a pas montré d'activité contre *E. Coli* jusqu'à la concentration maximale testée de: 40 µL/mL. Les valeurs de pourcentage d'inhibition et de viabilité cellulaire semblent démontrer un effet bactéricide de l'huile essentielle, mais avec le test de 24 H d'incubation à 37°C

la bactérie reprend une croissance cellulaire normale (annexe 3). Par conséquent il semblerait qu'à cette concentration, l'HE de *L. alba* n'ait qu'un effet bactériostatique. Néanmoins, cette HE a présenté une activité microbicide contre *P. Aeruginosa* et *S. aureus* de 5 µL/mL.

L'HE de Thym à Thymol (36.1%) a présenté une CMB de 0.4 µL/mL contre *E. coli*, résultat proche de celui obtenu par Rota *et al.*(2008); 0.5 µL/mL en utilisant la méthode de dilution en tube avec une HE de Thym à Thymol (57.7%) contre deux souches de *E. coli*.

De même, l'HE de Thym à Thymol a présenté une même CMB de 0.4 µL/mL contre *P. aeruginosa* et 0.2 µL/mL contre *S. aureus*.

Contre *Aspergillus niger*, Moghtader (2012) a obtenu un diamètre d'inhibition de 12 mm en utilisant une HE de Thym à Thymol (32.67%) au 1/16 et récemment, l'équipe de Miladi *et al.*(2013) en utilisant la méthode de dilution en micropuits ont obtenu les CMB suivantes avec une HE de Thym à Thymol (41.33%) : 1.56 mg/mL contre *E. coli* ATCC 35218, 3.12 mg/mL contre *P. aeruginosa* ATCC 27853 et 3.12 mg/mL avec *S. aureus* ATCC 25923, résultats très différents en comparaison de ceux que nous avons obtenus. C'est aussi le cas des résultats obtenus par la même équipe avec une HE de Romarin à 1.8 cinéol (24.10%) avec un contenu en camphre de 19.87% - l'huile que nous avons testé avait un contenu respectif en camphre et 1,8 cinéole de 31.8 et 18.4%. Outre certaines différences de conditions expérimentales, il est fort probable que les différences de résultats obtenus soient liées au fait que l'équipe de Miladi évalue leurs résultats de manière visuelle en observant la turbidité des puits.

Tableau 19. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) (µL/mL) des huiles essentielles et hydrolats non combinés et combinés sur les bactéries sélectionnées.

Huile Essentielle et Hydrolat	***E. coli* ATCC 25922**		***P. aeruginosa* ATCC 9027**		***S. aureus* ATCC 25923**	
HEs (non combinées)						
Pronto Alivio	>40		5.0		5.0	
Romarin	7.5		7.5		3.7	
Thym	0.4		0.4		0.2	
HDs (non combinées)						
Pronto Alivio	>500		>500		>500	
Romarin	>500		>500		>500	
Thym	>500		250		250	
Combinaisons (E1+E2) [a]	E1	E2	E1	E2	E1	E2
HE de Thym + HE de Pronto Alivio	0.2	2.5	0.2	2.5	0.2	1.2
HE de Thym + HE de Romarin	0.2	3.7	0.2	3.7	0.2	1.9
HE de Thym + HD de Thym	0.1	125	0.1	125	0.1	12 5
HE de Pronto Alivio + HE de Romarin	10.0	7.5	5.0	3.7	2.5	3.7

[a] E1 et E2 représentent respectivement le premier et le second extrait mentionnés dans la liste des combinaisons.

Tableau 20. Concentrations Minimales Fongicides (CMF) (µL/mL) des huiles essentielles et hydrolats non combinés et combinés sur les levures sélectionnées.

Huile Essentielle et Hydrolat	*C. albicans* CMPUJH022		*A. niger* ATCC 16404	
HEs (non combinées)				
Pronto Alivio	1.2		5.0	
Romarin	3.7		10.0	
Thym	0.2		0.4	
HDs (non combinées)				
Pronto Alivio	>500		>250	
Romarin	>500		>250	
Thym	250		250	
Combinaisons (E1+E2) [a]	E1	E2	E1	E2
HE de Thym + HE de Pronto Alivio	0.1	0.6	0.2	2.5
HE de Thym + HE de Romarin	0.1	0.9	0.4	7.5
HE de Thym + HD de Thym	0.1	62.5	0.2	125.0
HE de Pronto Alivio + HE de Romarin	0.6	0.9	2.5	7.5

[a] E1 et E2 représentent respectivement le premier et le second extrait mentionnés dans la liste des combinaisons.

L'index des Concentrations Fractionnaires Minimales Inhibitrices (CFMI) et les différents types d'interactions correspondantes ont ensuite été calculés et interprétés (Tableau 21). La combinaison entre l'HE et l'HD de Thym a été la seule à présenter un effet de synergie contre *E. coli* avec une CFMI de 0.5 contre cette souche. Ce résultat est surprenant en comparaison avec ceux obtenus avec les combinaisons entre l'HE de Thym et celles de Pronto Alivio et Romarin lesquelles ont présenté des CFMI respectives de 0.56 et 1. En effet, même si la différence entre 0.50 et 0.56 est faible, on suppose qu'une combinaison entre deux HE soit plus efficace qu'une combinaison HE-HD compte tenu de la diversité moléculaire de deux HE et l'effet que celle-ci pourrait impliquer.

Ces différences mènent à l'étude de la relation entre l'activité biologique et les molécules responsables, sujet discuté dans des travaux antérieurs avec deux tendances principales: l'attribution de l'activité biologique aux composés majoritaires (Farag *et al.*, 1989) et la contribution des composés mineurs à

l'activité antimicrobienne avec un effet de synergie ou une influence de potentialisation de l'HE comme suggéré par Rota *et al.* (2008).

Comme Gutierrez *et al.*(2008a) l'ont discuté, le mécanisme d'action et la composition des extraits sont des sujets qui doivent être analysés afin d'expliquer pourquoi la combinaison d'HEs montrant une forte efficacité antimicrobienne lorsqu'elles ne sont pas combinées ne présente pas un effet de synergie et de même, pourquoi l'HD de Thym avec une faible activité antimicrobienne individuelle est capable d'augmenter l'activité antibactérienne de l'HE de Thym tout spécialement contre *E. coli* et *P. aeruginosa* en divisant sa CMB par 4.

L'interaction entre l'HE de Thym et celle de Pronto Alivio est intéressante aussi car l'HE de Pronto Alivio non combinée ne montre aucune activité bactéricide contre *E. coli* jusqu'à 40 µL/mL, mais lorsqu'elle est mélangée avec l'HE de Thym sa CMB diminue jusqu'à 2.5 µL/mL et celle du Thym passe de 0.4 à 0.2 µL/mL, ce qui implique un effet additif très proche de la synergie avec une CMF de 0.56 laquelle a été calculée en considérant une CMB de l'HE de Pronto Alivio non combinée de 40.0 µL/mL alors que celle-ci est en réalité supérieure et par conséquent devrait donner une interaction de type synergique. Indépendamment de cette dernière observation, comme mentionné à la fin du sous-chapitre concernant l'activité antioxydante des combinaisons, en utilisant un autre index, cette interaction entre les deux HE serait interprétée comme synergique.

Il est fort probable que l'interaction positive entre ces deux HE soit liée à un effet potentialisateur de la Carvone et du Limonène, composés majoritaires de l'HE de Pronto Alivio, lesquels sont d'ailleurs reconnus pour être actifs contre un large spectre de levures et bactéries pathogènes chez l'être humain (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* and *A. niger*) et d'autres telles que *Trichophyton rubrum* responsable de l'onychomycose (Palá-Paúl *et al.* 2002).

De même, l'HE de Pronto Alivio non combinée présente une CMB de 5.0 µL/mL contre *P. aeruginosa*, S. aureus et *A. niger* et celle-ci est divisée par 2, 4 et 2 respectivement lorsque l'HE est mélangée avec celle du Thym, dont la CMB est

alors divisé par 2 contre *P. aeruginosa* et *A. niger* et ne change pas contre *S. aureus*.

Contre *C. albicans*, l'HE de Pronto Alivio a atteint une CMB de 1.2 µL/mL, nettement inférieure aux CMB présentées contre les autres souches, ce qui confirme d'ailleurs les résultats de cette activité biologique obtenue par Duarte *et al.* (2005) avec cette HE. Cette valeur est divisée par 2 lorsque l'HE est combinée à celle du Thym.

Le comportement de l'HE de Romarin est différent. En combinaison avec l'HE de Thym, sa CMB est divisée par 2 contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, par 4 contre *C. albicans* et diminue de 10 à 7.5 µL/mL contre *A. niger*, en montrant ainsi un effet d'addition contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans* et d'indifférence contre *S. aureus* et *A. niger*.

La combinaison de l'HE de Romarin avec celle de Pronto Alivio a montré un effet d'addition contre *C. albicans* et d'indifférence contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus.* Bien que l'HE de Romarin ait une forte concentration en camphre, molécule reconnue comme étant stimulante de l'efficacité antimicrobienne des terpénoïdes (Naigre *et al.* 1996), cet effet n'a pas été observé.

Excepté contre *S. aureus*, toutes les combinaisons impliquant l'HE de Thym ont un effet d'addition lié à la présence importante du Thym dont l'action est facilité par l'effet de gonflement de la membrane du au p-cymène (J Gutierrez *et al.* 2008).

L'HE de Pronto Alivio était la seule HE qui n'a pas montré d'activité contre *E. Coli* jusqu'à la concentration maximale testée de: 40 µL/mL. Les résultats obtenus pour les différents échantillons de cette HE contre *E. Coli* sont présentés dans l'Annexe 2. Les valeurs de pourcentage d'inhibition et de viabilité cellulaire semblent démontrer un effet bactéricide de l'huile essentielle, mais avec le test de 24 H d'incubation à 37ºC la bactérie reprend sa croissance cellulaire normalement. Par conséquent il semblerait qu'à cette concentration, l'HE de *L. Alba* n'ait qu'un effet bactériostatique.

Tableau 21. Index des Concentrations Fractionnaires Minimales Inhibitrices (CFMI) des combinaisons d'huiles essentielles et d'hydrolats sur les bactéries et levures sélectionnées.

Combinaisons	*E. coli*	Int[a]	*P. aeruginosa*	Int[a]	*S. aureus*	Int[a]	*C. albicans*	Int[a]	*A. niger*	Int[a]
HE de Thym + HE de Pronto Alivio	0.56	A	1,00	A	1,25	I	1,00	A	1,00	A
HE de Thym + HE de Romarin	1.00	A	1,00	A	1,50	I	0,75	A	1,75	I
HE de Thym + HD de Thym	0,50	S	0,75	A	1,00	A	0,75	A	1,00	A
HE de Pronto Alivio + HE de Romarin	1,25	I	1,50	I	1,50	I	0,75	A	1,25	I

[a] Interaction: Les résultats sont interprétés de la manière suivante: Synergie (S, FMC≤0.5), Addition (A, 0.5<FMC≤1), Indifférence (I, 1<FMC<2) ou Antagonisme (AN, FMC≥2).

Conclusion

Les résultats obtenus dans ce dernier chapitre corroborent certaines observations phytochimiques du chapitre 2 et mettent en évidence différents éléments en relation avec les huiles essentielles, les hydrolats, leurs combinaisons et applications médicinales.

Les activités biologiques antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de Thym obtenus avec la méthode de distillation conventionnelle sont plus importantes que celles des extraits obtenus avec le mode de distillation adapté. En effet, les différences de composition chimique de ces extraits, observées dans le chapitre 2, montrent que les huiles essentielles et hydrolats de Thym obtenus avec les deux méthodes de distillation se traduisent par un inversement des concentrations du thymol et du p-cymène. Les huiles essentielles obtenues par la méthode de distillation conventionnelle présentent des concentrations de thymol plus élevées. Dans le cas des hydrolats de Thym obtenus avec les deux lots, bien que des différences notables de composition chimique aient été observées, les résultats d'activité antimicrobienne et antioxydante des deux lots sont similaires. Par contre, les

résultats d'activité antioxydante et antimicrobienne obtenus avec les huiles essentielles de Romarin issues des deux méthodes ne sont pas aussi conséquents. Bien que les résultats d'activité antimicrobienne des deux types d'HE soient très similaires, les résultats d'activité antioxydante sont significativement différents. Dans ce dernier cas, il est possible que les variations des concentrations des molécules minoritaires aient un impact sur l'activité antioxydante.

Les résultats des activités biologiques obtenus avec les combinaisons HE Thym-HE Pronto Alivio et HE Thym-HD Thym ont démontré des interactions d'addition et de synergie. Dans le premier cas, l'interaction additive proche de la synergie semble être due à la diversité moléculaire du mélange. Dans le second, l'effet synergique surprenant du mélange hydrolat et huile essentielle – lesquels ont des compositions chimiques qualitatives similaires - pourrait être dû aux propriétés hydrophile et lipophile du mélange.

Les proportions des huiles essentielles et hydrolats utilisés en combinaison peuvent être prises en considération pour effectuer des mélanges ou des co-distillations avec les avantages suivants :

- Obtention d'une diversité moléculaire qui optimise les activités biologiques antioxydantes et antimicrobiennes mais aussi l'usage médicinal. Cette diversité moléculaire constitue un avantage particulier à l'encontre de la résistance développée par plusieurs microorganismes, problématique importante de nos jours compte tenu de l'usage extensif de produits « monomoléculaires ».
- Les huiles essentielles et hydrolats obtenus par co-distillations ou les mélanges d'huiles essentielles et d'hydrolats outre leur diversité moléculaire, présentent l'avantage d'avoir de plus faibles concentrations de molécules potentiellement toxiques. C'est le cas par exemple du thymol ou du camphre.

La co-distillation du Thym, Romarin et du Souci illustre parfaitement les deux points précédents. A la différence des huiles essentielles obtenues avec chaque plante séparément, l'huile essentielle obtenue par co-distillation présente une

variété moléculaire importante laquelle maintient les molécules majoritaires de chaque plante - le 1.8-cinéole et le camphre du Romarin et le Thymol et le p-cymène du Thym – diversifiant donc ses usages médicinaux tout en diminuant la toxicité de certaines de ses molécules puisque leur concentration est plus faible que dans les huiles de chaque plante.

Il est important de distinguer l'huile essentielle de l'hydrolat d'un point de vue physico-chimique par rapport à leurs voies d'application respectives. En effet, l'hydrolat, sera préféré par rapport à l'huile essentielle pour un usage par voie orale, non seulement pour sa phase aqueuse et par conséquent son assimilabilité par l'organisme, mais aussi pour ses concentrations moléculaires nettement plus faibles que celles de l'huile essentielle et donc plus sûres.

En ce qui concerne l'huile essentielle, la voie d'administration topique est priorisée compte tenu de son affinité avec la composition lipidique de l'épiderme. Par exemple, l'huile essentielle de Thym obtenue avec la méthode de distillation adaptée laquelle est plus concentrée en p-cymène, moins nocif que le thymol pour la santé présente des vertus médicinales relaxantes du système nerveux et antalgiques dont le patient pourra bénéficier par voie topique. En ce qui concerne l'hydrolat de la même plante, il pourrait constituer une alternative à l'eau dans la formulation d'un remède médicinal d'usage oral avec ses avantages antioxydants et antimicrobiens tout en présentant de faibles risques de toxicité compte tenu de ses concentrations faibles en phénols.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Deux objectifs principaux ont été atteints dans ces travaux de thèse. Le premier consistait à évaluer une méthode de distillation utilisant un macérât aqueux de la matière végétale comme source de vapeur comparativement à une méthode conventionnelle de distillation, afin d'étudier son impact sur les propriétés physico-chimiques des extraits obtenus et ainsi leurs potentiels d'objectivation. Cette comparaison a été effectuée en analysant la composition chimique et les activités antioxydante sur ABTS et antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* (Gram positif), *Escherichia coli* (Gram négatif), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif), *Candida albicans* et *Aspergillus niger* des HE et HD de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* cultivées au sud de Bogotá en Colombie.

Lippia alba, espèce originaire d'Amérique latine, cultivée à Guaduas, dans le département de Cundinamarca en Colombie, a été distillée avec la méthode conventionnelle de distillation. Les compositions chimiques de l'HE et HD de cette espèce ont été analysées.

Dans le cadre du second objectif, les mêmes activités biologiques précédemment citées ont été évaluées et discutées sur des combinaisons HE-HE et HE-HD des extraits non combinés ayant démontré des activités positives et ceux de *Lippia alba,* afin de les valoriser en tant que conservateurs de produits phytothérapeutiques.

La comparaison de la composition chimique, et des activités antioxydantes et antimicrobiennes des HE et HD obtenus en appliquant la méthode de distillation adaptée, utilisant le macérât de la plante comme source de vapeur avec ceux des HE et HD obtenus par la distillation conventionnelle n'améliore pas l'activité biologique des HE et HD. Ces premiers résultats mettent en évidence l'importance de la définition du chémotype ainsi que de l'analyse des autres composés chimiques qui constituent les HE et HD, non seulement d'un point de vue scientifique, mais aussi industriel, afin d'assurer l'activité biologique conséquente de l'extrait en tant que conservateur ou bien pour une indication thérapeutique spécifique.

Par conséquent, si le consommateur a des doutes concernant la sécurité des conservateurs synthétiques, leur substitution par des HE ou HD doit être correctement argumentée et contrôlée. C'est par ailleurs le défi principal pour l'industrie des produits naturels, laquelle doit être conséquente et constante non seulement dans le contrôle chimique de la production agricole de ses matières premières, mais aussi au niveau de sa chaîne de transformation.

Pour l'évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne des combinaisons d'HE et d'HD, j'ai adapté la méthode utilisant l'indice de Concentration Fractionnaire Inhibitrice (CFI) utilisée jusqu'à présent pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne, à l'étude d'interaction de combinaisons sur l'activité antioxydante.

Bien que la CI_{50} de l'HD de Thym obtenue était très élevée en comparaison de celle d'un antioxydant synthétique utilisé dans la formulation d'un produit cosmétique ou phytothérapeutique, la conservation antioxydante du produit peut être aussi assurée, si cet HD est utilisé en tant que principe actif à cette concentration élevée et que cette dernière n'implique pas d'effet collatéral ni secondaire. Par ailleurs, les résultats obtenus avec les mélanges entre l'HE et l'HD de *Thymus vulgaris* et de l'HE de *Thymus vulgaris* et celle de *Lippia alba* montrent que ces deux options de combinaisons représentent de bonnes alternatives dans un produit fini ayant les indications thérapeutiques de ces extraits pour évaluer leur activité conservatrice et la possibilité de mitiger leur impact sur l'odeur du produit fini.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude d'activités biologiques de combinaisons d'HE permettent aussi d'orienter la définition de proportions de différentes matières végétales pour réaliser directement une co-distillation afin d'augmenter la diversité de l'HE obtenue et par conséquent améliorer les résultats d'activité biologique.

Du fait de leur énorme variabilité, les HE ne sont considérées que comme des accompagnements thérapeutiques (Bonnafous, 2013) et ce, par principe de précaution. Néanmoins, l'HE peut avoir une activité propre et spécifique dans la mesure où plus qu'un coadjuvant, elle peut tout simplement dupliquer l'effet espéré par le biais de ses molécules majoritaires. En outre, les molécules minoritaires de l'HE pourront aussi participer à l'activité biologique

dépendamment de leurs concentrations. Dans le cas spécifique de l'activité antimicrobienne, la capacité de ce groupe moléculaire de contrer la résistance microbienne ne doit en aucun cas être sous-estimée.

L'approfondissement de l'information concernant l'activité biologique des composés majoritaires des 3 HE étudiées permet dans le chapitre 3 d'une part d'affirmer ou d'infirmer une activité biologique dépendamment de la concentration du métabolite dans l'HE utilisée directement en tant que produit fini ou en tant qu'ingrédient. D'autre part, si l'on prend en considération l'"espèce d'émulation" [6] entre les différents métabolites d'une HE ou d'un mélange d'HE la mise en évidence des différentes activités biologiques potentielles devient particulièrement complexe. C'est probablement cette émulation ou effet complexe d'interaction moléculaire qui permet d'expliquer non seulement l'effet d'addition important entre les HE de Thym et de Pronto Alivio, mais aussi la synergie surprenante entre l'HE et HD de Thym dont la diversité et concentration des molécules sont particulièrement faibles en comparaison de l'HE correspondante.

Ces résultats originaux mènent à l'étude de la relation entre l'activité biologique et les molécules responsables, sujet discuté dans des travaux antérieurs avec deux tendances principales: l'attribution de l'activité biologique aux composés majoritaires (Farag *et al.*, 1989) et la contribution des composés mineurs à l'activité antimicrobienne avec un effet de synergie ou une influence de potentialisation de l'HE comme suggéré par Rota *et al.* (2008).

En physiologie, la synergie est l'association de plusieurs organes pour l'accomplissement d'une fonction. La **synergie médicamenteuse est l'addition ou la potentialisation des effets de deux médicaments** (Définition Larousse). La notion de potentialisation implique que l'effet obtenu par deux molécules est supérieur à la somme des effets de chacune d'entre elles opérant de manière indépendante. Considérons un mélange moléculaire dans un extrait tel que l'huile essentielle ou bien même le cocktail moléculaire obtenu lorsque différentes huiles essentielles sont mélangées. Outre la

[6] Terme utilisé par Jean-Marie Pelt dans la citation du sous chapitre 1.6. de l'étude bibliographique concernant les interactions.

polyvalence de bio activités d'une seule molécule comme le 1,8 cinéol par exemple, pour laquelle la base de données de Duke répertorie 67 activités biologiques parmi lesquelles: antibactérienne, anti-inflammatoire, stimulant du système nerveux et gastroprotecteur, l'association « multi-moléculaire » fruit du mélange de différentes huiles essentielles impliquera non seulement la multiplication d'activités biologiques favorables ou défavorables, dépendamment de la composition chimique des huiles, et bien évidemment des concentrations de chacun des constituants pouvant être remède ou « poison ». Les interactions synergiques, additives, indifférentes ou antagoniques pourront être favorables ou défavorables pour l'organisme vivant qui reçoit ce mélange.

Deux types de synergie pourront implicitement dériver d'un tel mélange moléculaire:

- La première est l'association de plusieurs molécules pour l'accomplissement de différentes activités thérapeutiques, dont la somme sera plus importante que les effets isolés. Cette caractérisation reprend la définition physiologique du mot cité ci-avant indépendamment de la définition médicamenteuse, laquelle est différente. Un exemple est le mélange d'un extrait de Thym à thymol, antimicrobien puissant, avec un extrait d'ail contenant l'allicine immunostimulante et antimicrobienne elle aussi. Ce mélange permet non seulement d'éradiquer la levure responsable, source de l'affection avec des effets fongicide et immunostimulant respectivement. Ce dernier est fondamental car il accompagne l'organisme à réagir activement outre l'assistance fongicide qu'il reçoit.
- La seconde correspond à la synergie médicamenteuse, synergie de deux molécules, deux extraits qui en combinaison permettent d'atteindre des résultats supérieurs à ceux obtenus lorsqu'ils sont isolés.

Dans le cadre de la formulation phytothérapeutique, les mélanges d'huiles essentielles ou d'hydrolats dosés correctement peuvent permettre d'assurer non seulement l'activité médicinale du produit, mais aussi sa conservation tout au long de sa durée de vie utile.

Comme Gutierrez *et al.*(2008a) l'ont discuté, le mécanisme d'action et la composition des extraits sont des sujets qui doivent être analysés afin d'expliquer pourquoi la combinaison d'HEs, montrant une forte efficacité antimicrobienne non combinées, ne présente pas un effet de synergie et de même, pourquoi l'HD de Thym avec une faible activité antimicrobienne non combiné est capable d'augmenter l'activité antibactérienne de l'HE de Thym tout spécialement contre *E. coli* et *P. aeruginosa* en divisant sa CMB par 4. Enfin, dans le cas précédent, comme dans celui de la combinaison des HE de *T. vulgaris* et *L. alba* qui présentent un effet d'interaction d'addition, il est important de souligner le fait que la caractérisation de l'interaction dépend de la méthode appliquée. En effet, dans ces deux derniers cas, selon la méthode de l'isobolographe décrite par Altenburger *et al*, (1990) et Singh *et al.* (2000), l'interaction serait qualifiée de synergique et par conséquent recevrait une attention différente non seulement d'un point de vue scientifique mais aussi industriel.

L'absolu est le véritable ennemi du genre humain
Friedrich Schlegel

L'usage des plantes médicinales date de plus de 5 000 ans. En moins de deux cents ans, les vertus végétales ont finalement été réduites à l'isolement moléculaire.

C'est en pensant à cette réalité, mais aussi aux résultats obtenus et présentés dans cette thèse que le titre « **la complexité des simples** » m'a semblé approprié. S'il est vrai que je ne suis pas parvenu à trouver la raison pour laquelle les plantes médicinales étaient nommées les « simples » au moyen âge, je n'ai à présent aucun doute en ce qui concerne leur complexité !

Les différentes activités biologiques reportées dans la base de données de Duke (http://www.ars-grin.gov/duke/) pour les deux molécules principales de

chaque HE étudiée dans cette thèse sont reportées dans l'Annexe 12. Le 1,8-cinéole, le thymol et le limonène sont les molécules ayant le plus d'activités biologiques reportées dans cette base avec respectivement 67, 71 et 60 activités biologiques. Dans certains cas, Duke reporte les valeurs d'IC_{50} ou de concentrations inhibitrices reportées par les auteurs pour atteindre l'activité concernée. Par exemple, le limonène présente une ED50 de 0.197 mg/mL pour obtenir un effet antispasmodique. Cependant chacune de ces informations doit être approfondie de manière à mettre en évidence la posologie à respecter dépendamment des conditions du patient. Bien que ce tableau soit « simpliste » puisqu'il ne présente que les deux composés majoritaires de chaque HE étudiée dans le cadre de cette thèse - lesquelles étaient constituées de 6 à 11 molécules dont le pourcentage relatif était supérieur ou égal à 1% - il illustre cependant le degré de complexité qui doit être considéré et assidument respecté lorsque l'on formule un produit thérapeutique avec un mélange d'huiles essentielles en respectant différents critères de qualité.

La qualité n'est pas un critère indépendant de la sécurité et de l'efficacité tel que le considère l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans son document « Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005 » (OMS, 2002). La **qualité** en tant que critère absolu doit intégrer des sous critères qui permettent d'assurer la **sécurité** et l'**efficacité** du produit thérapeutique en répondant positivement à la question : Les concentrations de chaque ingrédient utilisé dans ce produit sont-elles nécessaires et suffisantes pour assurer son innocuité, sa stabilité et ses indications thérapeutiques ?
Bien que les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et de *Thymus vulgaris* fassent partie des HE les plus communes, avec celles d'*Eucalyptus globulus, Eucalyptus citriodora, Citrus aurantium*, Citrus sinensis, *Matricaria recutita* ou *Mentha piperita* pour n'en citer que quelques-unes parmi les plus utilisées, il n'existe, 5000 ans plus tard, aucune norme suffisamment exhaustive qui permette, sans laisser aucun doute, de répondre positivement à la question précédente. Cette absence de norme implique donc un manque de paramètre utilisable dans le domaine scientifique pour optimiser de manière sûre et efficace la transition entre la recherche et le développement de nouveaux

remèdes médicinaux à base d'huiles essentielles et hydrolats. C'est la recherche qui doit fournir les paramètres nécessaires et suffisants pour conditionner et établir les normes en les adaptant à la biodiversité moléculaire des extraits végétaux, laquelle implique inévitablement une diversité d'activité biologique. La lenteur de cette définition normative européenne est à la hauteur non seulement des différences de types culturels et scientifiques au sein de la communauté, mais aussi et peut-être surtout de l'adaptation nécessaire et suffisante de ces paramètres à cette diversité moléculaire et ses conséquences sur la conceptualisation de la méthode d'analyse d'activités biologiques tout en considérant la diversité postérieure des indications thérapeutiques, effets secondaires et collatéraux qui dériveront inévitablement de cette diversité moléculaire ou diversité biologique qui constitue, bien qu'on ait souvent tendance à l'oublier, la source ou cause de l'évolution.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aazza, Smail, Badiâ Lyoussi, and Maria G. Miguel. 2011. "Antioxidant Activity of Some Morrocan Hydrosols." *Journal of Medicinal Plants Research* 5(30):6688–96.
2. Abu-Darwish, M. S. and Z. H. M. Abu-Dieyeh. 2009. "Essential Oil Content and Heavy Metals Composition of *Thymus vulgaris* Cultivated in Various Climatic Regions of Jordan." *International Journal of Agriculture and Biology* 11(1):59–63.
3. Acar, J. F. and F. W. Goldstein. 1998. "Consequences of Increasing Resistance to Antimicrobial Agents." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 27 Suppl 1:S125–30.
4. Adams, Robert. 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectroscopy*. edited by Robert Adams. Allured Pub. Corp. 804 pp.
5. Adelon, N. P. 1835. *Dictionnaire de Médecine*. Tome XI. Édition non précisée. 519pp.
6. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS). 2008. *Recommandations Relatives Aux Critères de Qualité Des Huiles Essentielles Contribution Pour L ' Évaluation de La Sécurité Recommandations Relatives Aux Critères de Qualité Des Huiles Essentielles*.
7. Ahmed, S. Ben Hadj 2011. "Evaluation of Antileishmanial, Cytotoxic and Antioxidant Activities of Essential Oils Extracted from Plants Issued from the Leishmaniasis-Endemic Region of Sned (Tunisia)." *Natural product research* 25(12):1195–1201. Retrieved November 14, 2013 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740286).
8. Akrout, Ahmed *et al.* 2010. "Chemical and Biological Characteristics of Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* Cultivated in Djerba." *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 13(4):398–411.
9. Al-Bayati, F., 2008. "Synergistic Antibacterial Activity between *Thymus vulgaris* and Pimpinella Anisum Essential Oils and Methanol Extracts." *Journal of ethnopharmacology* 116(3):403–6.
10. Altenburger, R., W. Bödeker, M. Faust, and L. H. Grimme. 1990. "Evaluation of the Isobologram Method for the Assessment of Mixtures of Chemicals. Combination Effect Studies with Pesticides in Algal Biotests." Ecotoxicology and environmental safety 20:98–114.
11. Antolovich, Michael, Paul D. Prenzler, Emilios Patsalides, Suzanne McDonald, and Kevin Robards. 2002. "Methods for Testing Antioxidant Activity." *The Analyst* 127(1):183–98.
12. Arena, E., B. Fallico, and E. Maccarone. 2001. "Evaluation of Antioxidant Capacity of Blood Orange Juices as Influenced by Constituents, Concentration Process and Storage." *Food Chemistry* 74(4):423–27.
13. Armisen, M., V. Rodriguez, and C. Vidal. 2003. "Photoaggravated Allergic Contact Dermatitis due to *Rosmarinus officinalis* Cross- reactive with *Thymus vulgaris*." *Contact dermatitis* 52–54.

14. Arnao, Marino B. 2001. "Some Methodological Problems in the Determination of Antioxidant Activity Using Chromogen Radicals : A Practical Case." 11(2000):419–21.
15. Arnao, Marino B., Antonio Cano, and Manuel Acosta. 2001. "Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Activity Contribution to Total Anti-Oxidant Activity." *Food Chemistry* 73(2):239–44.
16. Balansard, G. 1990. "analyse critique des protocoles pharmacologiques utilises pour la recherche d'extraits et de substances pures d'origine." Actes du 1er Colloque Européen d'Ethnopharmacologie Metz 22–25 mars: 229–241.
17. Bassolé, IHN and HR Juliani. 2012. "Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties." Molecules 3989–4006.
18. De Beer, Dalene, Elizabeth Joubert, Wentzel C. a Gelderblom, and Marena Manley. 2003. "Antioxidant Activity of South African Red and White Cultivar Wines: Free Radical Scavenging." Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:902–9.
19. Begot, Claire, Isabelle Desnier, Jean D. Daudin, Jean C. Labadie, and André Lebert. 1996. "Recommendations for Calculating Growth Parameters by Optical Density Measurements." Journal of Microbiological Methods 25(3):225–32.
20. Belaiche, P. (1979). Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Maloine. 204 pp.
21. Benzie, Iris F. F. 2003. "Evolution of Dietary Antioxidants." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 136(1):113–26.
22. Bermond, P. (1990). *Biological effects of food antioxidants*. In Food antioxidants, ed. Hudson. London: Elsevier
23. Blanco, M. a, Colareda, G. a, van Baren, C., Bandoni, A. L., Ringuelet, J., & Consolini, A. E. (2013). Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia* alba. Journal of Ethnopharmacology, 149(3), 803–9. doi:10.1016/j.jep.2013.08.007
24. Blois, Marsden S. 1958. "Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical." *Nature* 181(4617):1199–1200.
25. Blumenthal, M. 1998. *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Churchill. Retrieved June 6, 2014.
26. Bonnafous, Catherine. 2013. *Traité Scientifique Aromathérapie Aromatologie et Aromachologie*. Éditions Dangles. 522 pp.
27. Boruga, O., C. Jianu, I. Gole, Gruia At, and Horhat Fg. 2014. *Thymus vulgaris* Essential Oil : Chemical Composition and Antimicrobial Activity. Journal of medicine and life 7(3):56–60.
28. Bosson, Lydia. 2011. *L'hydrolathérapie*. Amyris. 192 pp.
29. Boyraz, Nuh and Musa Ozcan. 2006. "Inhibition of Phytopathogenic Fungi by Essential Oil, Hydrosol, Ground Material and Extract of Summer Savory (Satureja Hortensis L.) Growing Wild in Turkey." *International journal of food microbiology* 107(3):238–42.

30. Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity." *LWT - Food Science and Technology* 28(1):25–30.
31. Bruneton, J. 1999. "Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes Médicinales." 3ème Ed Lavoisier Techniques et Documentations. 1136 pp.
32. Buchanan, BB, W. Gruissem, and RL Jones.(Eds) 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA.
33. Burt, Sara. 2004. "Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods--a Review." *International journal of food microbiology* 94(3):223–53.
34. Cáceres, A. 1996. "Plantas de Uso Medicinal En Guatemala." Editorial Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. 386 pp.
35. Candan, Ferda *et al.* 2003. "Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Essential Oil and Methanol Extracts of Achillea Millefolium Subsp. Millefolium Afan. (Asteraceae)." *Journal of Ethnopharmacology* 87(2-3):215–20.
36. Cano, A., Acosta, M., & Arnao, M. B. (2000). A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, *5*(6), 365–370. doi:10.1179/135100000101535933
37. Carlini, E. A., A. B. de Oliveira, and G. G. de Oliveira. 1983. "Psychopharmacological Effects of the Essential Oil Fraction and of the Hydrolate Obtained from the Seeds of Licaria Puchury-Major." *Journal of ethnopharmacology* 8(2):225–36.
38. Carlton, Robert R., Peter G. Waterman, Alexander I. Gray, and Stanley G. Deans. 1992. "The Antifungal Activity of the Leaf Gland Volatile Oil of Sweet Gale (Myrica Gale) (Myricaceae)." *Chemoecology* 3:55–59.
39. Celiktas, O. Yesil *et al.* 2007. "Antimicrobial Activities of Methanol Extracts and Essential Oils of *Rosmarinus officinalis*, Depending on Location and Seasonal Variations." *Food Chemistry* 100(2):553–59.
40. Chalchat, JC, R. P. Garry, and A. Michet. 1991. "Chemical Composition of Essential Oil of Calendula *officinalis* L.(Pot Marigold)." *Flavour and fragrance Journal* 6(3):179-182.
41. Chaudière, J. and R. Ferrari-Iliou. 1999. "Intracellular Antioxidants: From Chemical to Biochemical Mechanisms." *Food and Chemical Toxicology* 37:949.
42. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Seventh Edition." *Performance standards for antimicrobial susceptibility"*
43. Couic-Marinier, Françoise and Annelise Lobstein. 2013. "Les Huiles Essentielles Gagnent Du Terrain À L'officine." *Actualites Pharmaceutiques* 52(525):18–21.
44. Dellacassa, E. 2010. *Normalización de Productos Naturales Obtenidos de Especies de La Flora Aromática Latinoamericana: Proyecto CYTED IV. 20*.

45. Dimitrijević, Suzana I., Katarina R. Mihajlovski, Dušan G. Antonović, Mirjana R. Milanović-Stevanović, and Dušan Ž. Mijin. 2007. "A Study of the Synergistic Antilisterial Effects of a Sub-Lethal Dose of Lactic Acid and Essential Oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and Origanum Vulgare L." *Food Chemistry* 104(2):774–82.
46. Djabou, Nassim, Mohamed El Amine Dib, Boufeldja Tabti, Jean Costa, and Alain Muselli. 2014. "Chemical Composition and Antioxidant Activity of Hydrosol Extracts Obtained by Liquid–liquid Extraction (LLE) of Daucus Muricatus L." *Journal of Essential Oil Research* 26(6):393–99.
47. Dorman, HJ Damien, SG Deans, RC Noble, and P. Surai. 1995. "Evaluation in Vitro of Plant Essential Oils as Natural Antioxidants." *Journal of Essential Oil Research* 7(6): 645-51.
48. Duarte, Marta Cristina Teixeira, Glyn Mara Figueira, Adilson Sartoratto, Vera Lúcia Garcia Rehder, and Camila Delarmelina. 2005. "Anti-Candida Activity of Brazilian Medicinal Plants." *Journal of ethnopharmacology* 97(2):305–11.
49. Duthie, G. and A. Crozier. 2000. "Plant-Derived Phenolic Antioxidants." *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 3:447–51.
50. Edwards, Philip R. and William Howell Ewing. 1986. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. Elsevier.
51. Engelbertz, Jonas, Matthias Lechtenberg, Lena Studt, Andreas Hensel, and Eugen J. Verspohl. 2012. "Bioassay-Guided Fractionation of a Thymol-Deprived Hydrophilic Thyme Extract and Its Antispasmodic Effect." *Journal of Ethnopharmacology* 141(3):848–53.
52. EUCAST. 2000. "EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology Relating to Methods for the Determination of Susceptibility of Bacteria to Antimicrobial Agents." *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 6(9):503–8.
53. Fahim, F. A. and Amr Y. Esmat. 1999. "Allied Studies on the Effect of *Rosmarinus officinalis* L. on Experimental Hepatotoxicity and Mutagenesis." *international journal of food sciences and nutrition 50 (6): 413-427.*
54. Faleiro, M. L. *et al.* 2003. "Antimicrobial Activity of Essential Oils Isolated from Portuguese Endemic Species of *Thymus*." *Letters in Applied Microbiology* 36(1):35–40.
55. Farag, R. S., Z. Y. Daw, F. M. Hewedi, and G. S. A. El Baroty. 1989. "Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spice Essential Oils." *Journal of Food Protection* 52:665–67.
56. Fernandez, Mercedes *et al.* 2004. "EEG during Lavender and Rosemary Exposure in Infants of Depressed and Non-Depressed Mothers." *Infant Behavior and Development* 27(1):91–100.
57. Finley, J. and M. S. Otterburn. 1993. "The Consequence of Free Radical in Foods." *Toxicology and Industrial Health* 77–91.
58. Franchomme, P., R. Jollois, and D. Pénoël. 2001. *L'aromathérapie Exactement. Encyclopédie de L'utilisation Thérapeutique Des Huiles Essentielles.* Editions Roger Jollois.

59. Friedman, Mendel, Philip R. Henika, and Robert E. Mandrell. 2002. "Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against Campylobacter Jejuni, Escherichia Coli, Listeria Monocytogenes, and Salmonella Enterica." *Journal of food protection* 65(10):1545–60.
60. Fukumoto L. and G. Mazza. 2000. "Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 3597-3604.
61. García- Plazaola, JI and JM Becerril. 1999. "High- performance Liquid Chromatography Method to Measure Lipophilic Antioxidants in Stressed Plants: Simultaneous Determination of Carotenoids and Tocopherols." *Phytochemical Analysis* 10(6): 307-313..
62. Gayda, Arnaud. 2013. Étude des principales huiles essentielles utilisées en rhumatologie.. Thèse doctorale. Faculté de pharmacie. Université Toulouse III Paul Sabatier.
63. Gazim, Z. *et al.* 2008. "Antifungal activity of the essential oil from Calendula *officinalis* Growing in Brazil." 39(1): 61-63.
64. Gholoum, Fadheelah A. 2013. "Antimicrobial Effect of Some Plants and Herbs." *International Journal of Engineering and Science* 3(11):20–29.
65. Giordani, R. *et al.* 2004. "Antifungal Effect of Various Essential Oils against Candida Albicans. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*." *Phytotherapy Research* 18(12):990–95.
66. Giordani, Roger, Youcef Hadef, and Jacques Kaloustian. 2008. "Compositions and Antifungal Activities of Essential Oils of Some Algerian Aromatic Plants." *Thymus* 79:199–203.
67. Govaris, A., N. Solomakos, A. Pexara, and P. S. Chatzopoulou. 2010. "The Antimicrobial Effect of Oregano Essential Oil, Nisin and Their Combination against Salmonella Enteritidis in Minced Sheep Meat during Refrigerated Storage." *International journal of food microbiology* 137(2-3):175–80.
68. Gracza, L. 1987. "Oxygen-Containing Terpene Derivatives from Calendula *officinalis*." *Planta medica* 53(2):227.
69. Guin, Jere D. 2001. "Rosemary Cheilitis: One to Remember." *Contact Dermatitis* 45(1):63–63.
70. Gupta, MP. 1995. "270 Plantas Medicinales Iberoamericanas." Éditions Convenio Andres Bello. 617 pp.
71. Gurgel do Vale, T., E. Couto Furtado, J. G. Santos, and G. S. B. Viana. 2002. "Phytomedicine Central Effects of Citral , Myrcene and Limonene , Constituents of Essential Oil Chemotypes." *Phytomedicine* 9:709–14.
72. Gutierrez, J., C. Barry-Ryan, and P. Bourke. 2008. "The Antimicrobial Efficacy of Plant Essential Oil Combinations and Interactions with Food Ingredients." *International journal of food microbiology* 124(1):91–97.
73. Gutierrez, J., C. Barry-Ryan, and P. Bourke. 2009. "Antimicrobial Activity of Plant Essential Oils Using Food Model Media: Efficacy,

Synergistic Potential and Interactions with Food Components." *Food microbiology* 26(2):142–50.
74. Gutierrez, Jorge, Gabriel Rodriguez, Catherine Barry-Ryan, and Paula Bourke. 2008. "Efficacy of Plant Essential Oils against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria Associated with Ready-to-Eat Vegetables: Antimicrobial and Sensory Screening." *Journal Of Food Protection* 71(9):1846–54.
75. Hajlaoui, H. *et al.* 2010. "Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of the Essential Oils of Five Tunisian Aromatic Plants." *Italian Journal of Food Science* 22:320–29.
76. Hammer, K. a, C. F. Carson, and T. V Riley. 1999. "Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plant Extracts." *Journal of applied microbiology* 86(6):985–90.
77. Harborne, Jeffrey B. and Christine A. Williams. 2000. "Advances in Flavonoid Research since 1992." *Phytochemistry* 55:481–504.
78. Helander, Ilkka M. *et al.* 1998. "Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(9):3590–95.
79. Hoffmann, Laurent. 2003. "Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transférase (HCT). Thèse doctorale. Faculté de biologie moléculaire et cellulaire. Université Louis Pasteur.
80. Holley, Richard a. and Dhaval Patel. 2005. "Improvement in Shelf-Life and Safety of Perishable Foods by Plant Essential Oils and Smoke Antimicrobials." *Food Microbiology* 22(4):273–92.
81. Huang, D., B. Ou, and R. L. Prior. 2005. "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856.
82. Hussain, Abdullah Ijaz, Farooq Anwar, Syed Tufail Hussain Sherazi, and Roman Przybylski. 2008. "Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Basil (Ocimum Basilicum) Essential Oils Depends on Seasonal Variations." *Food Chemistry* 108(3):986–95.
83. Imeh, U. and S. Khokhar. 2002. "Distribution of Conjugated and Free Phenols in Fruits: Antioxidant Activity and Cultivar Variations." Journal of Agricultural and Food Chemistry 50:6301-6306
84. Imelouane, B. *et al.* 2009. "Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco." *Int. J. Agric. Biol* 11(2):205–8.
85. Inouye, S., M. Takahashi, and S. Abe. 2008. "A Comparative Study on the Composition of Forty Four Hydrosols and Their Essential Oils." *… Journal of Essential Oil …* 89–105.
86. Institute, Clinical and Laboratory Standards. 2007. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Seventeenth Informational Supplement*.
87. Inui, Shigeki and Ichiro Katayama. 2005. "Allergic Contact Dermatitis Induced by Rosemary Leaf Extract in a Cleansing Gel." *The Journal of dermatology* 32(8):667–69.

88. Ishige, K., D. Schubert, and Y. Sagara. 2001. "FLAVONOIDS PROTECT NEURONAL CELLS FROM OXIDATIVE STRESS." 30(4):433–46.
89. Janssen, A. M., N. L. Chin, J. J. Scheffer, and A. Baerheim Svendsen. 1986. "Screening for Antimicrobial Activity of Some Essential Oils by the Agar Overlay Technique." *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition* 8:289–92.
90. Jiménez, A., A. Selga, JL Torres, and L. Julià. 2004. "Reducing Activity of Polyphenols with Stable Radicals of the TTM Series. Electron Transfer versus H-Abstraction Reactions in Flavan-3-Ols." Organic letters 6(24): 4583-4586.
91. Johnston, Moira D. 1998. "A Simple and Rapid Test for Quality Control of Liquid Media, Using the Bioscreen Microbiological Growth Analyser." *Journal of Microbiological Methods* 32(1):37–43.
92. Jordan, M., R. Martinez, K. Goodner, E. Baldwin, and J. Sotomayor. 2006. "Seasonal Variation of *Thymus* Hyemalis Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. Essential Oils Composition." *Industrial Crops and Products* 24(3):253–63.
93. Jouki, Mohammad, Seyed Ali Mortazavi, Farideh Tabatabaei Yazdi, and Arash Koocheki. 2014. "Characterization of Antioxidant–antibacterial Quince Seed Mucilage Films Containing Thyme Essential Oil." *Carbohydrate Polymers* 99:537–46.
94. Kähkönen, M. P. *et al.* 1999. "Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds." *Journal of agricultural and food chemistry* 47:3954–62.
95. Kaloustian, J. *et al.* 2008. "Étude De Six Huiles Essentielles : Composition Chimique Et Activité Antibactérienne." *Phytothérapie* 6(3):160–64.
96. Karadag, Ayse, Beraat Ozcelik, and Samim Saner. 2009. "Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities." *Food Analytical Methods* 2(1):41–60.
97. Kenneth, J. Ryan and C. George Ray. 2004. "Sherris Medical Microbiology." McGraw-Hill Medical.
98. Khan, Mohd Sajjad Ahmad and Iqbal Ahmad. 2011. "Antifungal Activity of Essential Oils and Their Synergy with Fluconazole against Drug-Resistant Strains of Aspergillus Fumigatus and Trichophyton Rubrum." *Applied microbiology and biotechnology* 90(3):1083–94.
99. Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(13), 3713–3717. doi:10.1021/jf020071c
100. Kim, Y.-S., Hwang, C.-S., & Shin, D.-H. (2005). Volatile constituents from the leaves of Polygonum cuspidatum S. et Z. and their anti-bacterial activities. Food Microbiology, 22(1), 139–144. doi:10.1016/j.fm.2004.01.016
101. Kumar, Ashok, Ravindra Shukla, Priyanka Singh, Chandra Shekhar Prasad, and Nawal Kishore Dubey. 2008. "Assessment of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil as a Safe Botanical Preservative against Post Harvest Fungal Infestation of Food Commodities." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9(4):575–80.

102. L'Europe, Conseil de. 2002. *Pharmacopée Européenne. Quatrième Édition*. Strasbourg: (DEQM), Direction de la Qualité du Médicament du Conseil de l'Europe.
103. Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research : PTR*, *18*(6), 435–48. doi:10.1002/ptr.1465
104. Lahlou, M., Berrada, R., & Hmamouchi, M. (2001). Molluscicidal activity of thirty essential oils on Bulinus truncatus. *Therapie*, *56*(1), 71–72. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11322026
105. Lambert, RJW and PN Skandamis. 2001. "A Study of the Minimum Inhibitory Concentration and Mode of Action of Oregano Essential Oil, Thymol and Carvacrol." *Journal of applied Microbiology 91(3):* 453–62.
106. Lamy, J., Combe, Maghami, Passet, and Perottino. 1979. *Etude Du Rendement et de La Qualité de L'huile Essentielle En Fonction Du Stade de La Récolte*. Chambre d'agriculture de la Drôme.
107. Lemańska, K. and H. Szymusiak. 2001. "The Influence of pH on Antioxidant Properties and the Mechanism of Antioxidant Action of Hydroxyflavones." Science 31(7) *869-881.*
108. Lens-Lisbonne-C, A. Cremieux, C. Maillard, and G. Balansard. 1987. "Methods for Evaluation of Antibacterial Activity of Essential Oils: Application to Essences of Thyme and Cinnamon." *Journal de pharmacie de Belgique* 42:297–302.
109. Leuschner, J. 1997. "Reproductive Toxicity Studies of D-Camphor in Rats and Rabbits." *Arzneimittel-Forschung* 47(2):124–28.
110. Lis- Balchin, M., H. Steyrl, and E. Krenn. 2003. "The Comparative Effect of Novel Pelargonium Essential Oils and Their Corresponding Hydrosols as Antimicrobial Agents in a Model Food System." *Phytotherapy research* 65(September 2001):60–65.
111. López, P., C. Sánchez, R. Battle, and C. Nerín. 2005. "Solid and Vapor Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils Susceptibility of Selected Foodborne Bacterial and Fungal strains." Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(17) 6939–46.
112. Macdonald-wicks, Lesley K., Lisa G. Wood, and Manohar L. Garg. 2006. "Methodology for the Determination of Biological Antioxidant Capacity in Vitro : A Review." 2056(August):2046–56.
113. Magalhães, Luís M., Marcela a Segundo, Salette Reis, and José L. F. C. Lima. 2008. "Methodological Aspects about in Vitro Evaluation of Antioxidant Properties." *Analytica chimica acta* 613(1):1–19.
114. Mantle, David *et al.* 1998. "Comparison of Methods for Determination of Total Antioxidant Status: Application to Analysis of Medicinal Plant Essential Oils." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 121:385–91.
115. Marczal, G., Z. Cserjesi, and E. Hethelyi. 1987. "Data on the Essential Oil Content and Composition of Calendula *officinalis* L."
116. Medina, Angel, Ronald J. W. Lambert, and Naresh Magan. 2012. "Rapid Throughput Analysis of Filamentous Fungal Growth Using Turbidimetric Measurements with the Bioscreen C: A Tool for Screening Antifungal Compounds." *Fungal biology* 116(1):161–69.

117. Melgarejo, Nelson, Guadalupe Alvaerez, and Antonio Alonso. 2004. *Guia Práctica Para La Prescripción Fitoterapéutica En La Atención Primaria de Salud*. edited by MINSAP - Ministerio de Salud Pública Cuba.
118. Mesa-Arango, Ana Cecilia *et al.* 2009. "Citral and Carvone Chemotypes from the Essential Oils of Colombian *Lippia* Alba (Mill.) N.E. Brown: Composition, Cytotoxicity and Antifungal Activity." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(6):878–84.
119. Michalet, Serge. 2015. Conférence "Intérêt Des Sources Naturelles Pour La Recherche de Príncipes Actifs." Lyon Stage FC 03/02/15 Serge Michalet Ph. D, Pharm. D Faculté de Pharmacie Université Claude Bernard Lyon 1.
120. Miguel, M. G. 2010. "Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review." *Molecules* 15(12):9252–87.
121. Miladi, Hanene *et al.* 2013. "Essential Oil of *Thymus vulgaris* L . and *Rosmarinus officinalis* L .: Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis , Cytotoxicity and Antioxidant Properties and Antibacterial Activities against Foodborne Pathogens." *Natural Science* 5(6):729–39.
122. Miller, N. J., C. Rice-Evans, V. Gopinathan, and A. Milner. 1993. "A-Novel-Method-for-Measuring-Antioxidant-Capacity-and-Its-Application-to-Monitoring-the-Antioxidant-Status-in-Premature-neonates." Clinical-Science 84(4): 407-412.
123. Moghtader, M. 2012. "Antifungal Effects of the Essential Oil from *Thymus vulgaris* L . and Comparison with Synthetic Thymol on Aspergillus Niger." *Journal of Yeast and Fungal Research* 3(December):83–88.
124. Molyneux, Philip. 2004. "The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity." *Songklanakarin J Sci Technol* 26: 211-219.
125. Moon, Therese, Jenny M. Wilkinson, and Heather M. a Cavanagh. 2006. "Antiparasitic Activity of Two Lavandula Essential Oils against Giardia Duodenalis, Trichomonas Vaginalis and Hexamita Inflata." *Parasitology research* 99(6):722–28.
126. Moretti, Mario D. L., Alessandra T. Peana, Giovanni Sanna Passino, and Vincenzo Solinas. 1998. "Effects of Soil Properties on Yield and Composition of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil." *Journal of Essential Oil Research* 10(3):261–67.
127. Morton, JF. 1981. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Bahamas to Yucatan*. Springfiel.
128. Mosmann, T. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of immunological methods* 65(1-2):55–63.
129. Moss, Mark, Jenny Cook, Keith Wesnes, and Paul Duckett. 2003. "Aromas of Rosemary and Lavender Essential Oils Differentially Affect Cognition and Mood in Healthy Adults." *International Journal of Neuroscience* 113(1):15–38.
130. Moyer, R. a., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *Journal of Agricultural and*

Food Chemistry, *50*(3), 519–525. doi:10.1021/jf011062r

131. Nadeem, Sg, Amna Shafiq, and St Hakim. 2013. "Effect of Growth Media, pH and Temperature on Yeast to Hyphal Transition in Candida Albicans." *Open Journal of Medical Microbiology* 3(September):185–92.
132. Naderi-Hajibagher Kandi, M. 2011. "The Effects of Different Distillation Methods on Quality and Quantity of Essential Oil of Laurus Nobilis L."
133. Naghdi Badi, Hassanali, Darab Yazdani, Sajed Mohammad Ali, and Fatemeh Nazari. 2004. "Effects of Spacing and Harvesting Time on Herbage Yield and Quality/quantity of Oil in Thyme, *Thymus vulgaris* L." *Industrial Crops and Products* 19(3):231–36.
134. Naigre, Ruth, Philippe Kalck, Christine Roques, Isabelle Roux, and Georges Michel. 1996. "Comparison of Antimicrobial Properties of Monoterpenes and Their Carbonylated Products." *Planta Medica* 62(3):275–77.
135. Nazer, a. I., a. Kobilinsky, J. L. Tholozan, and F. Dubois-Brissonnet. 2005. "Combinations of Food Antimicrobials at Low Levels to Inhibit the Growth of Salmonella Sv. Typhimurium: A Synergistic Effect?" *Food Microbiology* 22(5):391–98.
136. Nedorostova, L., P. Kloucek, L. Kokoska, M. Stolcova, and J. Pulkrabek. 2009. "Antimicrobial Properties of Selected Essential Oils in Vapour Phase against Foodborne Bacteria." *Food Control* 20(2):157–60.
137. Nejad Ebrahimi, S., J. Hadian, M. H. Mirjalili, a. Sonboli, and M. Yousefzadi. 2008. "Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Thymus* Caramanicus at Different Phenological Stages." *Food Chemistry* 110(4):927–31.
138. Nowak, Agnieszka, Danuta Kalemba, Lucjan Krala, Malgorzata Piotrowska, and Agata Czyzowska. 2012. "The Effects of Thyme (*Thymus vulgaris*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Essential Oils on Brochothrix Thermosphacta and on the Shelf Life of Beef Packaged in High-Oxygen Modified Atmosphere." *Food microbiology* 32(1):212–16.
139. Ojeda-Sana, Adriana M., Catalina M. van Baren, Miguel a. Elechosa, Miguel a. Juárez, and Silvia Moreno. 2013. "New Insights into Antibacterial and Antioxidant Activities of Rosemary Essential Oils and Their Main Components." *Food Control* 31(1):189–95.
140. Okoh, O. O., A. P. Sadimenko, O. T. Asekun, and A. J. Afolayan. 2008. "The Effects of Drying on the Chemical Components of Essential Oils of Calendula *officinalis* L ." 7(10):1500–1502.
141. Omidbaigi, R., *et al.*, 2008. "Harvest time effecting on the essential oil content and composition of *Thymus vulgaris*." Journal of Essential Oil Bearing Plants 11: 162–67.
142. OMS. 1999. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants, Vol. 1*.
143. OMS. 2002. "Estrategias de La OMS Sobre Medicina Tradicional."
144. OMS. 2009. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Vol. 4.*
145. Orfila, M. *et al.* 1837. *CODEX, PHARMACOPÉE FRANÇAISE*.
146. Oussalah, Mounia, Linda Saucier, and Monique Lacroix. 2007. "Inhibitory E V Ects of Selected Plant Essential Oils on the Growth of Four

Pathogenic Bacteria : E . Coli O157 : H7 , Salmonella Typhimurium , Staphylococcus Aureus and Listeria Monocytogenes." 18:414–20.
147. Ozgen, M. 2006. "Modified 2 , 2-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2 , 2 ′ -Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) Methods." Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(4): 1151–57.
148. Pelt, JM. 2010. Les dons précieux de la nature. Éditions Fayard. 243 pp.
149. Palá-Paúl, Jesús, Arturo Velasco-Negueruela, M. José Pérez-Alonso, and Jesús Sanz. 2002. "Antimicrobial Activity Profiles of the Two Enantiomers of Limonene and Carvone Isolated from the Oils of Mentha Spicata and Anethum Sowa." *Flavour and Fragrance Journal* 17(1):59–63.
150. Paolini, Julien, Christelle Leandri, Jean-Marie Desjobert, Toussaint Barboni, and Jean Costa. 2008. "Comparison of Liquid-Liquid Extraction with Headspace Methods for the Characterization of Volatile Fractions of Commercial Hydrolats from Typically Mediterranean Species." *Journal of chromatography. A* 1193(1-2):37–49.
151. Paparella, Antonello *et al.* 2008. "Flow Cytometric Assessment of the Antimicrobial Activity of Essential Oils against Listeria Monocytogenes." *Food Control* 19(12):1174–82.
152. Papet, Yves, Bertrand Brunet, and Patrick Mura. 2010. "Headspace (HS) and Solid Phase Micro-Extraction (SPME). Theory and Applications." *Ann Toxicol Anal* 22:75–79.
153. Parize, Perrine *et al.* 2009. "Antifungal Therapy of Aspergillus Invasive Otitis Externa: Efficacy of Voriconazole and Review." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(3):1048–53.
154. Pasqua, R. Di and V. De Feo. 2005. "In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria." *Annals of Microbiology* 55(2):139–43.
155. Pei, Rui-Song, Feng Zhou, Bao-Ping Ji, and Jing Xu. 2009. "Evaluation of Combined Antibacterial Effects of Eugenol, Cinnamaldehyde, Thymol, and Carvacrol against E. Coli with an Improved Method." *Journal of food science* 74(7):M379–83.
156. Peng, Fumin, Liangquan Sheng, Baizhan Liu, Hongwu Tong, and Shaomin Liu. 2004. "Comparison of Different Extraction Methods: Steam Distillation, Simultaneous Distillation and Extraction and Headspace Co-Distillation, Used for the Analysis of the Volatile Components in Aged Flue-Cured Tobacco Leaves." *Journal of Chromatography A* 1040(1):1–17.
157. Pérez-Jiménez, Jara and Fulgencio Saura-Calixto. 2008. "Anti-Oxidant Capacity of Dietary Polyphenols Determined by ABTS Assay: A Kinetic Expression of the Results." *International Journal of Food Science & Technology* 43(1):185–91.
158. Petrovic, L., Z. Lepojevic, V. Sovilj, D. Adamovic, and V. Tesevic. 2010. "Composition of Essential Oil Obtained from Tubular, Head and Ligulate Flowers of Calendula *officinalis* L. by Steam Distillation of Plant

Material and CO2 Extracts." *Journal of Essential Oil Research* 22(2):143–46.
159. Pietta, Pier Giorgio. 2000. "Flavonoids as Antioxidants." *Journal of Natural Products* 63:1035–42.
160. Pino Alea, Jorge a., Ariel G. Ortega Luis, Arístides Rosado Pérez, Mayra Rodríguez Jorge, and Ricardo Baluja. 1996. "Composición Y Propiedades Antibacterianas Del Aceite Esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown." *Revista Cubana de Farmacia* 30(1).
161. Pitt, John I. and Ailsa D. Hocking. 2009. *Fungi and Food Spoilage. Springer.*
162. Pokorný, J., HTT Nguyen, and J. Korczak. 1997. "Antioxidant Activities of Rosemary and Sage Extracts in Sunflower Oil." *Food/Nahrung*.
163. Popovici, J., C. Bertrand, E. Bagnarol, M. P. Fernandez, and G. Comte. 2008. "Chemical Composition of Essential Oil and Headspace-Solid Microextracts from Fruits of Myrica Gale L. and Antifungal Activity." *Natural product research* 22(12):1024–32.
164. Price, L. and S. Price. 2004. *Understanding Hydrolats: The Specific Hydrosols for Aromatherapy A Guide for Health Professionals*. Churchill .
165. Prior, R. L. 2003. "Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen Radical Absorbance Capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples."
166. Prior, R. L., X. Wu, and K. Schaich. 2005. "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements." *Journal of agricultural and food …* 4290–4302.
167. Ramarathnam, Narasimhan and Toshihiko Osawa. 1994. "The Contribution of Plant Food Antioxidants to Human Health." (1985):75–82.
168. Ran, Huimin, Daniel J. Hassett, and Gee W. Lau. 2003. "Human Targets of Pseudomonas Aeruginosa Pyocyanin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(24):14315–20.
169. Rašković, Aleksandar *et al.* 2014. "Antioxidant Activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oil and Its Hepatoprotective Potential." *BMC complementary and alternative medicine* 14:225.
170. Rauha, Jussi Pekka *et al.* 2000. "Antimicrobial Effects of Finnish Plant Extracts Containing Flavonoids and Other Phenolic Compounds." *International Journal of Food Microbiology* 56:3–12.
171. Re, R., N. Pellegrini, and A. Proteggente. 1999. "ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL." 26(98):1231–37.
172. Remmal, A., T. Bouchikhi, A. Tantaoui-Elaraki, and M. Ettayebi. 1993. "Inhibition of Antibacterial Activity of Essential Oils by Tween 80 and Ethanol in Liquid Medium." *Journal de pharmacie de Belgique* 48(5):352–56.
173. Remmal, Adnane, Touria Bouchikhi, Khadija Rhayour, Mohamed Ettayebi, and Abdelrhafour Tantaoui-Elaraki. 1993. "Improved Method for the Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils in Agar Medium." *Journal of Essential Oil Research* 5(2):179–84.

174. Rice-Evans, Catherine, Nicholas Miller, and George Paganga. 1997. "Antioxidant Properties of Phenolic Compounds." *Trends in Plant Science* 2:152–59.
175. Roginsky, V. and E. Lissi. 2005. "Review of Methods to Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity in Food." *Food Chemistry* 92(2):235–54.
176. Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., & Antonietta Milillo, M. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. Phytomedicine, 14, 727–732. doi:10.1016/j.phymed.2007.01.005
177. Rossi-Rodrigues, BC. *et al.*, 2009. "Comparative Growth of Trichoderma Strains in Different Nutritional Sources, Using Bioscreen C Automated System." *Brazilian Journal of Microbiology* 40(2): 404-410.
178. Rota, María C., Antonio Herrera, Rosa M. Martínez, Jose a. Sotomayor, and María J. Jordán. 2008. "Antimicrobial Activity and Chemical Composition of *Thymus Vulgaris*, *Thymus Zygis* and *Thymus Hyemalis* Essential Oils." *Food Control* 19(7):681–87.
179. Rustaiee, Ali Reza *et al.* 2013. "Genetic Diversity and Chemical Polymorphism of Some *Thymus* Species." *Chemistry and Biodiversity* 10(6):1088–98.
180. Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, *91*(4), 621–632. doi:10.1016/j.foodchem.2004.06.031
181. Sagdic, O. and M. Ozcan. 2003. "Antibacterial Activity of Turkish Spice Hydrosols." *Food Control* 14:141–43.
182. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. a., & Saura-calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficienc y of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *76*(2), 270–276. Retrieved from http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9/abstract
183. Sangwan, N. S., A. H. A. Farooqi, F. Shabih, and R. S. Sangwan. 2001. "Regulation of Essential Oil Production in Plants." 34: 3-21.
184. Schelz, Zsuzsanna, Joseph Molnar, and Judit Hohmann. 2006. "Antimicrobial and Antiplasmid Activities of Essential Oils." *Fitoterapia* 77(4):279–85.
185. Sefidkon, F., K. Abbasi, Z. Jamzad, and S. Ahmadi. 2007. "The Effect of Distillation Methods and Stage of Plant Growth on the Essential Oil Content and Composition of Satureja Rechingeri Jamzad." *Food Chemistry* 100:1054–58.
186. Singh, P. K., B. F. Tack, P. B. McCray, and M. J. Welsh. 2000. "Synergistic and Additive Killing by Antimicrobial Factors Found in Human Airway Surface Liquid." *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 279:L799–805.

187. Smith-Palmer, a, J. Stewart, and L. Fyfe. 1998. "Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils and Essences against Five Important Food-Borne Pathogens." *Letters in applied microbiology* 26(2):118–22.
188. Snoussi, Mejdi *et al.* 2008. "In-Vitro Anti-Vibrio Spp. Activity and Chemical Composition of Some Tunisian Aromatic Plants." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(12):3071–76.
189. Soliman, K. M. and R. I. Badeaa. 2002. "Effect of Oil Extracted from Some Medicinal Plants on Different Mycotoxigenic Fungi." *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 40(11):1669–75.
190. Solomakos, N., a Govaris, P. Koidis, and N. Botsoglou. 2008. "The Antimicrobial Effect of Thyme Essential Oil, Nisin and Their Combination against Escherichia Coli O157:H7 in Minced Beef during Refrigerated Storage." *Meat science* 80(2):159–66.
191. Souza, K. S., J. S. Chaar, K. M. T. Oliveira, E. O. Gomes, and C. N. Portela. 2007. "Atividade Biológica de Extratos, Hidrolatos E Óleos Voláteis de Pau-Rosa (Aniba Duckei Kostermans) E Quantificação Do Linalol No Hidrolato de Folhas." *Rev. Bras. Pl. Med.* 9:1–7.
192. Stashenko, Elena. 2009. *Aceites Esenciales*. CENIVAM.
193. Stashenko, Elena E., Beatriz E. Jaramillo, and Jairo René Martínez. 2004. "Comparison of Different Extraction Methods for the Analysis of Volatile Secondary Metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, Grown in Colombia, and Evaluation of Its in Vitro Antioxidant Activity." *Journal of Chromatography A* 1025(1):93–103.
194. Svoboda, K. P. 1998. "Biomass Production, Essential Oil Yield and Composition of Myrica Gale L. Harvested from Wild Populations in Scotland and Finland." *Flavour and Fragrance Journal* 13:367–72.
195. Svoboda, KP and JB Hampson, 1999. "Bioactivity of Essential Oils of Selected Temperate Aromatic Plants: Antibacterial, Antioxidant, Antiinflammatory and Other Related Pharmacological Activities." *for the 21st century, ADEME/IENICA* 1–17.
196. Tangarife-Castaño, V., Betancur, L., Mesa, A.C., *et al.* 2012. "Antifungal Activity of Verbenaceae And Labiatae Families Essential Oils." *pharmacologyonline* 1.
197. Tannous, Pierre, Rodolfo Juliani, Mingfu Wang, and Jim Simon. 2004. "Water Balance in Hydrosol Production Via Steam Distillation : Case Study Using Lavandin (Lavandula X Intermedia)." pp. 1–15.
198. Tavassoli, S. K., S. M. Mousavi, and S. H. Razavi. 2011. "Chemical Composition and Evaluation of Antimicrobial Properties of *Rosmarinus officinalis* L . Essential Oil." *African Journal of Biotechnology* 10(63):13895–99.
199. Theis, Nina and Manuel Lerdau. 2003. "The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites." *International Journal of Plant Sciences* 164:S93–102.
200. Trombetta, Domenico *et al.* 2005. "Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(6):2474–78.

201. Tura, Debora and Kevin Robards. 2002. "Sample Handling Strategies for the Determination of Biophenols in Food and Plants." *Journal of Chromatography A* 975:71–93.
202. Ultee, A., M. H. J. Bennik, and R. Moezelaar. 2002. "The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen Bacillus Cereus." *Applied and Environmental Microbiology* 68(4):1561–68.
203. Ultee, Annemieke, Edwin P. W. Kets, Mark Alberda, Folkert A. Hoekstra, and Eddy J. Smid. 2000. "Bacillus Cereus." 233–38.
204. UNCTAD. 2005. *Market Brief in the European Union for Selected Natural Ingredients Derived from Native Species. Lippia Alba. Prontoalivio, Erva Cidreira, Juanilama, Melissa.*
205. Vale, T. G., F. J. A. Matos, T. C. M. De Lima, and G. S. B. Viana. 1999. "Behavioral Effects of Essential Oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown Chemotypes." *Journal of Ethnopharmacology* 67(2):127–33.
206. Veras, Helenicy N. H. *et al.* 2011. "*Lippia alba* (Mill .) N . E . Essential Oil Interfere with Aminoglycosides Effect Against Staphylococcus Aureus." *Journal of Essential Oil Bearing Plants* (May 2014):37–41.
207. Viuda-Martos, Manuel, Yolanda Ruiz-Navajas, Juana Fernández-López, and José Angel Pérez-Álvarez. 2008. "Antibacterial Activity of Different Essential Oils Obtained from Spices Widely Used in Mediterranean Diet." *International Journal of Food Science & Technology* 43(3):526–31.
208. Wang, W., N. Wu, Y. G. Zu, and Y. J. Fu. 2008. "Antioxidative Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Compared to Its Main Components." *Food Chemistry* 108(3):1019–22.
209. Wright, JS, ER Johnson, and GA DiLabio. 2001. "Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants." *Journal of the American Chemical Society 123(6): 1173-1183.*
210. Yang, Seun-Ah, Sang-Kyung Jeon, Eun-Jung Lee, Chang-Hyun Shim, and In-Seon Lee. 2010. "Comparative Study of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Six Essential Oils and Their Components." *Natural product research* 24(2):140–51.
211. Youdim, Kuresh A. and Stanley G. Deans. 1999. "Dietary Supplementation of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Essential Oil during the Lifetime of the Rat: Its Effects on the Antioxidant Status in Liver, Kidney and Heart Tissues." *Mechanisms of Ageing and Development* 109:163–75.
212. Zaouali, Y., C. Messaoud, a. Ben Salah, and M. Boussaïd. 2005. "Oil Composition Variability among Populations in Relationship with Their Ecological Areas in Tunisian*Rosmarinus officinalis* L." *Flavour and Fragrance Journal* 20(5):512–20.
213. Zaouali, Yosr, Taroub Bouzaine, and Mohamed Boussaid. 2010. "Essential Oils Composition in Two *Rosmarinus officinalis* L. Varieties and Incidence for Antimicrobial and Antioxidant Activities." *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 48(11):3144–52.

214. Zeman, Florence. 2008. "Toxicité D'un Mélange Binaire Sur La Daphnie Daphnia Magna : Etude Des Effets Biologiques de L'Uranium et Du Sélénium Seuls et En Mélange." Institut de Radioprotection et de sûreté nucléaire.

ANNEXES

Annexe 1. IC50 des huiles essentielles de *T. Vulgaris* sur le DPPH

Date	# Essai	Échantillon	Gammes de concentrations utilisées	30 mn	185 mn
02/12/13	1	TvDCHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	406,03	162,737
02/12/13	1	TvDCHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	444,92	176,181
02/12/13	3	TvDCHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	456,85	175,249
02/12/13	3	TvDCHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	479,60	178,502
02/12/13	3	TvDCHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	441,64	176,647
05/12/13	5	TvDCHE1	50 à 300 ppm (6 u.)	542,41	172,268
05/12/13	5	TvDCHE1	50 à 300 ppm (6 u.)	393,02	153,403
05/12/13	5	TvDCHE1	50 à 300 ppm (6 u.)	487,25	175,042
03/12/13	4	TvDCHE2	12,5 à 400 ppm (6 u.)	488,74	202,530
03/12/13	4	TvDCHE2	12,5 à 400 ppm (6 u.)	455,44	179,845
03/12/13	4	TvDCHE2	12,5 à 400 ppm (6 u.)	487,22	203,575
05/12/13	5	TvDCHE2	12,5 à 400 ppm (6 u.)	474,97	184,667
05/12/13	5	TvDCHE2	12,5 à 400 ppm (6 u.)	509,03	197,274
05/12/13	5	TvDCHE2	12,5 à 400 ppm (6 u.)	593,47	209,938
10/12/13	8	TvDCHE2	50 à 300 ppm (6 u.)	490,74	205,047
10/12/13	8	TvDCHE2	50 à 300 ppm (6 u.)	524,48	239,150
03/12/13	4	TvDCHE3	12,5 à 400 ppm (6 u.)	466,53	191,176
03/12/13	4	TvDCHE3	12,5 à 400 ppm (6 u.)	477,44	191,658
03/12/13	4	TvDCHE3	12,5 à 400 ppm (6 u.)	442,94	189,401
17/12/13	8	TvDCHE3	50 à 300 ppm (6 u.)	611,31	223,686
17/12/13	8	TvDCHE3	50 à 300 ppm (6 u.)	684,01	226,733
17/12/13	8	TvDCHE3	50 à 300 ppm (6 u.)	681,44	218,030
17/12/13	8	TvDCHE3	50 à 300 ppm (6 u.)	574,82	205,030
02/12/13	3	TvDFHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	520,01	200,774
02/12/13	3	TvDFHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	570,61	210,958
02/12/13	3	TvDFHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	592,87	204,106
02/12/13	3	TvDFHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	492,70	191,278
02/12/13	3	TvDFHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	543,71	195,160
05/12/13	3	TvDFHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	489,06	204,863
05/12/13	3	TvDFHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	620,82	229,339
05/12/13	3	TvDFHE1	12,5 à 400 ppm (6 u.)	618,73	240,275
03/12/13	4	TvDFHE2	12,5 à 400 ppm (6 u.)	591,82	225,367
03/12/13	4	TvDFHE2	12,5 à 400 ppm (6 u.)	547,00	218,215
03/12/13	4	TvDFHE2	12,5 à 400 ppm (6 u.)	725,67	235,886
05/12/13	5	TvDFHE2	50 à 300 ppm (6 u.)	571,02	226,099
05/12/13	5	TvDFHE2	50 à 300 ppm (6 u.)	642,02	236,005
05/12/13	5	TvDFHE2	50 à 300 ppm (6 u.)	577,34	217,847
05/12/13	5	TvDFHE2	50 à 300 ppm (6 u.)	720,41	240,955
10/12/13	8	TvDFHE2	50 à 300 ppm (6 u.)	865,30	296,703
10/12/13	8	TvDFHE2	50 à 300 ppm (6 u.)	821,75	284,951
03/12/13	4	TvDFHE3	12,5 à 400 ppm (6 u.)	661,65	242,872
03/12/13	4	TvDFHE3	12,5 à 400 ppm (6 u.)	644,75	223,219
03/12/13	4	TvDFHE3	12,5 à 400 ppm (6 u.)	561,64	217,690
03/12/13	4	TvDFHE3	12,5 à 400 ppm (6 u.)	627,87	226,338
17/12/13	8	TvDFHE3	50 à 300 ppm (6 u.)	746,35	261,726
17/12/13	8	TvDFHE3	50 à 300 ppm (6 u.)	852,44	257,511
17/12/13	8	TvDFHE3	50 à 300 ppm (6 u.)	691,31	242,843

Annexe 2. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB en µl/L.) des HE et HD contre *Escherichia coli*.

Date	Code	Gammes de concentration	CMB	Viabilité (%)	% d'inhibition - 24H	Croissance sur Agar
29/05/14	TvDCHE1	800 à 200	400	-5,1%	100,0	N
03/06/14	TvDCHE1	800 à 200	400	1,0%	98,5	N
04/06/14	TvDCHE1	800 à 200	400	1,4%	98,3	N
29/05/14	TvDCHE2	800 à 200	400	21,3%	100,0	N
03/06/14	TvDCHE2	800 à 200	400	3,3%	98,9	N
05/06/14	TvDCHE2	800 à 200	400	0,0%	99,7	N
29/05/14	TvDCHE3	800 à 200	400	32,1%	100,0	N
03/06/14	TvDCHE3	800 à 200	400	3,8%	98,3	N
05/06/14	TvDCHE3	800 à 200	400	0,0%	1,0	N
29/05/14	TvDFHE1	1600 à 400	800	-2,4%	100,0	N
03/06/14	TvDFHE1	1600 à 400	800	4,3%	99,3	N
04/06/14	TvDFHE1	1600 à 400	800	5,1%	98,6	N
29/05/14	TvDFHE2	1600 à 400	800	13,0%	100,00	N
03/06/14	TvDFHE2	1600 à 400	800	4,7%	98,95	N
04/06/14	TvDFHE2	1600 à 400	800	5,1%	98,70	N
29/05/14	TvDFHE3	1600 à 400	800	2,3%	100,00	N
03/06/14	TvDFHE3	1600 à 400	800	5,2%	99,22	N
04/06/14	TvDFHE3	1600 à 400	800	5,0%	99,23	N
03/06/14	RoDCHE1	7500 à 1875	7500	2,0%	97,33	N
04/06/14	RoDCHE1	7500 à 1875	7500	4,3%	98,50	N
05/06/14	RoDCHE1	7500 à 1875	7500	0,0%	98,38	N
03/06/14	RoDCHE2	7500 à 1875	7500	4,7%	97,86	N
04/06/14	RoDCHE2	7500 à 1875	7500	4,6%	99,35	N
05/06/14	RoDCHE2	7500 à 1875	7500	0,0%	97,43	N
03/06/14	RoDCHE3	7500 à 1875	7500	4,9%	98,10	N
04/06/14	RoDCHE3	7500 à 1875	7500	3,5%	98,24	N
05/06/14	RoDCHE3	7500 à 1875	7500	0,0%	97,90	N
03/06/14	RoDFHE1	7500 à 1875	7500	2,2%	97,32	N
04/06/14	RoDFHE1	7500 à 1875	7500	2,8%	97,78	N
05/06/14	RoDFHE1	7500 à 1875	7500	0,0%	97,03	N
03/06/14	RoDFHE2	7500 à 1875	7500	1,2%	97,67	N
04/06/14	RoDFHE2	7500 à 1875	7500	0,0%	97,74	N
05/06/14	RoDFHE2	7500 à 1875	7500	0,0%	97,70	N
03/06/14	RoDFHE3	7500 à 1875	7500	1,4%	98,25	N
04/06/14	RoDFHE3	7500 à 1875	7500	0,0%	98,24	N
05/06/14	RoDFHE3	7500 à 1875	7500	0,0%	97,86	N
04/06/14	LaDCHE1	40000 à 5000	>40000	11,0%	93,60	O
17/09/14	LaDCHE1	40000 à 10000	>40000	6,5%	93,8	O
22/09/14	LaDCHE1	40000 à 10000	>40000	11,9%	93,4	O
22/09/14	TvDCHD1	500000 à 125000	>500000	0,6%	98,5	O
17/09/14	TvDFHD1	500000 à 125000	>500000	1,1%	98,3	N
22/09/14	TvDFHD1	500000 à 125000	>500000	1,6%	97,3	O
17/09/14	RoDCHD1	500000 à 125000	>500000	68,5%	65,6	O
22/09/14	RoDCHD1	500000 à 125000	>500000	22,9%	72,3	O
17/09/14	RoDFHD1	500000 à 125000	>500000	38,8%	79,1	O
22/09/14	RoDFHD1	500000 à 125000	>500000	38,7%	71,6	O
22/09/14	LaDCHD1	500000 à 125000	>500000	14,4%	79,9	O

Annexe 3. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB en µl/L.) des combinaisons contre *Escherichia coli*.

Date	Code	Gammes de concentration	CMB	% d'inhibition - 24H	Viabilité (%)	Croissance sur Agar
27/05/14	TvDCHE1 / LaDCHE1	400 à 100 / 5000 à 1250	200/2500	98,1	NA	N
29/05/14	TvDCHE1 / LaDCHE1	400 à 100 / 5000 à 1250	200/2500	100,0	3,0%	N
04/06/14	TvDCHE1 / LaDCHE1	400 à 100 / 5000 à 1250	200/2500	98,7	0,8%	N
29/05/14	TvDCHE1 / RoDCHE1	400 à 100 / 7500 à 1875	200/3750	100,0	0,5%	N
03/06/14	TvDCHE1 / RoDCHE1	400 à 100 / 7500 à 1875	200/3750	98,8	0,3%	N
04/06/14	TvDCHE1 / RoDCHE1	400 à 100 / 7500 à 1875	200/3750	99,0	0,8%	N
29/05/14	RoDCHE1 / LaDCHE1	7500 à 1875 / 10000 à 2500	7500/10000	100,0	-4,2%	N
04/06/14	RoDCHE1 / LaDCHE1	7500 à 3750 / 10000 à 5000	7500/10000	98,6	1,2%	N
05/06/14	RoDCHE1 / LaDCHE1	7500 à 1875 / 10000 à 2500	7500/10000	96,0	0,1%	N

Annexe 4. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB en µl/L.) des HE et HD contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Date	Code	Gammes de concentration	CMB	Viabilité (%)	% d'inhibition - 24H	Croissance sur Agar
09/06/14	TvDCHE1	800 à 200	400	0,2%	99,2	N
10/06/14	TvDCHE1	800 à 200	400	0,1%	98,9	N
12/06/14	TvDCHE1	800 à 200	400	1,3%	99,2	N
09/06/14	TvDCHE2	800 à 200	400	5,9%	99,5	N
10/06/14	TvDCHE2	800 à 200	400	1,8%	99,4	N
12/06/14	TvDCHE2	800 à 200	400	4,3%	98,9	N
09/06/14	TvDCHE3	800 à 200	400	5,8%	99,2	N
10/06/14	TvDCHE3	800 à 200	400	0,2%	99,1	N
12/06/14	TvDCHE3	800 à 200	400	2,2%	99,8	N
09/06/14	TvDFHE1	1600 à 400	800	6,3%	99,0	N
10/06/14	TvDFHE1	1600 à 400	800	1,9%	99,6	N
12/06/14	TvDFHE1	1600 à 400	800	4,6%	99,4	N
09/06/14	TvDFHE2	1600 à 400	800	5,5%	99,0	N
10/06/14	TvDFHE2	1600 à 400	800	1,0%	99,3	N
20/08/14	TvDFHE2	1600 à 400	800	0,4%	99,7	N
09/06/14	TvDFHE3	1600 à 400	800	3,8%	98,8	N
10/06/14	TvDFHE3	1600 à 400	800	1,2%	99,3	N
12/06/14	TvDFHE3	1600 à 400	800	4,8%	99,3	N
09/06/14	RoDCHE1	7500 à 1875	7500	1,5%	97,6	N
10/06/14	RoDCHE1	7500 à 1875	7500	4,2%	92,1	N
20/08/14	RoDCHE1	7500 à 1875	7500	1,5%	98,0	N
09/06/14	RoDCHE2	7500 à 1875	7500	1,5%	96,5	N
10/06/14	RoDCHE2	7500 à 1875	7500	1,5%	96,6	N
12/06/14	RoDCHE2	7500 à 1875	7500	1,2%	97,4	N
09/06/14	RoDCHE3	7500 à 1875	7500	1,8%	96,7	N
10/06/14	RoDCHE3	7500 à 1875	7500	0,8%	96,6	N
20/08/14	RoDCHE3	7500 à 1875	7500	1,2%	98,0	N
09/06/14	RoDFHE1	7500 à 1875	3750	1,7%	97,1	N
10/06/14	RoDFHE1	7500 à 1875	3750	1,4%	97,2	N
12/06/14	RoDFHE1	7500 à 1875	3750	-0,5%	98,0	N
09/06/14	RoDFHE2	7500 à 1875	3750	2,4%	97,7	N
10/06/14	RoDFHE2	7500 à 1875	3750	3,7%	96,5	N
12/06/14	RoDFHE2	7500 à 1875	3750	1,7%	98,4	N
09/06/14	RoDFHE3	7500 à 1875	3750	0,5%	97,6	N
10/06/14	RoDFHE3	7500 à 1875	3750	4,7%	97,3	N
12/06/14	RoDFHE3	7500 à 1875	3750	5,5%	98,2	N
09/06/14	LaDCHE1	20000 à 5000	5000	2,0%	98,3	N
10/06/14	LaDCHE1	10000 à 2500	5000	2,1%	97,6	N
26/08/14	LaDCHE1	5000 à 1250	5000	3,9%	87,6	N
20/08/14	TvCHD1	500000 à 125000	3E+05	1,0%	98,7	N
26/08/14	TvCHD1	500000 à 125000	3E+05	0,4%	99,1	N
28/08/14	TvCHD1	500000 à 125000	3E+05	0,6%	98,5	N
20/08/14	TvFHD1	500000 à 125000	3E+05	0,6%	99,2	N
26/08/14	TvFHD1	500000 à 125000	3E+05	0,3%	99,4	N
28/08/14	TvFHD1	500000 à 125000	3E+05	0,8%	98,0	N
17/09/14	RoDCHD1	500000 à 125000	>500000	228,0%	-16,8	O
22/09/14	RoDCHD1	500000 à 125000	>500000	55,2%	47,5	O
17/09/14	RoDFHD1	500000 à 125000	>500000	153,4%	-8,2	O
22/09/14	RoDFHD1	500000 à 125000	>500000	35,8%	52,1	O
17/09/14	LaDCHD1	500000 à 125000	>500000	94,8%	44,2	O
22/09/14	LaDCHD1	500000 à 125000	>500000	38,1%	54,3	O

Annexe 5. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB en µl/L.) des combinaisons contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Date	Code	Gammes de concentration	CMB	Viabilité (%)	% d'inhibition - 24H	Croissance sur Agar
09/06/14	TvDCHE1 / LaDCHE1	400 à 100 / 5000 à 1250	200/2500	0,0%	99,3	N
10/06/14	TvDCHE1 / LaDCHE1	400 à 100 / 5000 à 1250	200/2500	0,6%	99,0	N
12/06/14	TvDCHE1 / LaDCHE1	400 à 100 / 5000 à 1250	200/2500	7,2%	99,7	N
09/06/14	TvDCHE1 / RoDCHE1	400 à 100 / 3750, 3750 et 1875	200/3750	1,0%	99,0	N
10/06/14	TvDCHE1 / RoDCHE1	200, 200, 100 / 3750, 1875, 1875	200/3750	1,2%	99,0	N
12/06/14	TvDCHE1 / RoDCHE1	200, 200, 100 / 3750, 1875, 1875	200/3750	4,3%	99,4	N
09/06/14	RoDCHE1/LaDCHE1	7500, 3750, 1875 / 10000, 5000, 2500	3750/5000	3,8%	98,5	N
12/06/14	RoDCHE1/LaDCHE1	3750, 1875, 937,5 / 5000, 2500, 1250	3750/5000	8,8%	98,8	N
20/08/14	RoDCHE1/LaDCHE1	3750, 1875, 937,5 / 5000, 2500, 1250	3750/5000	1,1%	98,2	N
26/08/14	TvDCHE1 / TvCHD1	200 à 50 / 250000 à 62500	100/125000	0,7%	99,8	N
28/08/14	TvDCHE1 / TvCHD1	200 à 50 / 250000 à 62500	100/125000	0,4%	99,0	N
22/09/14	TvDCHE1 / TvCHD1	200 à 50 / 250000 à 62500	100/125000	0,2%	99,0	N

Annexe 6. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB en µl/L.) des HE et HD contre *Staphylococcus aureus*.

Date	Code	Gammes de concentration	CMB	Viabilité (%)	% d'inhibition - 24H	Croissance sur Agar
24/06/14	TvDCHE1	400 à 100	200	6,1%	99,2	N
25/06/14	TvDCHE1	400 à 100	200	10,1%	96,8	N
20/08/14	TvDCHE1	400 à 100	200	1,6%	99,3	N
18/06/14	TvDCHE2	400 à 100	200	3,4%	99,3	N
24/06/14	TvDCHE2	400 à 100	200	0,3%	99,4	N
25/06/14	TvDCHE2	400 à 100	200	2,9%	98,5	N
18/06/14	TvDCHE3	400 à 100	200	8,4%	99,4	N
24/06/14	TvDCHE3	400 à 100	200	5,6%	99,4	N
20/08/14	TvDCHE3	400 à 100	200	0,2%	100,4	N
24/06/14	TvDFHE1	800 à 200	400	1,0%	99,2	N
25/06/14	TvDFHE1	800 à 200	400	9,3%	99,0	N
20/08/14	TvDFHE1	400 à 100	400	0,4%	100,2	N
18/06/14	TvDFHE2	800 à 200	400	3,5%	98,5	N
24/06/14	TvDFHE2	800 à 200	400	2,2%	98,9	N
25/06/14	TvDFHE2	800 à 200	400	12,2%	97,2	N
18/06/14	TvDFHE3	800 à 200	400	13,2%	98,7	N
24/06/14	TvDFHE3	800 à 200	400	0,2%	100,1	N
25/06/14	TvDFHE3	800 à 200	400	8,0%	98,6	N
24/06/14	RoDCHE1	7500 à 1875	3750	-6,7%	95,2	N
25/06/14	RoDCHE1	7500 à 1875	3750	13,3%	98,3	N
20/08/14	RoDCHE1	7500 à 1875	3750	8,4%	92,8	N
24/06/14	RoDCHE2	3750 à 1875	3750	NA	95,5	N
20/08/14	RoDCHE2	7500 à 1875	3750	1,4%	96,1	N
26/08/14	RoDCHE2	7500 à 1875	3750	4,2%	94,3	N
19/06/14	RoDCHE3	7500 à 1875	3750	7,4%	96,2	N
20/08/14	RoDCHE3	7500 à 1875	3750	2,0%	97,1	N
26/08/14	RoDCHE3	7500 à 1875	3750	3,2%	95,9	N
19/06/14	RoDFHE1	7500 à 1875	3750	4,2%	96,9	N
20/08/14	RoDFHE1	7500 à 1875	3750	3,6%	96,8	N
26/08/14	RoDFHE1	7500 à 1875	3750	1,0%	96,8	N
24/06/14	RoDFHE2	7500 à 1875	3750	9,1%	93,3	N
20/08/14	RoDFHE2	7500 à 1875	3750	3,8%	96,3	N
26/08/14	RoDFHE2	7500 à 1875	3750	2,8%	95,8	N
19/06/14	RoDFHE3	7500 à 1875	3750	6,0%	93,1	N
20/08/14	RoDFHE3	7500 à 1875	3750	5,7%	95,5	N
26/08/14	RoDFHE3	7500 à 1875	3750	5,1%	95,2	N
20/08/14	LaDCHE1	5000 à 1250	>5000	6,2%	95,1	O
28/08/14	LaDCHE1	5000 à 1250	>5000	0,5%	99,1	O
17/09/14	LaDCHE1	5000 à 1250	>5000	5,1%	95,6	O
16/06/14	TvDCHD1	500 000 à 125 000	250000	8,1%	99,8	N
26/08/14	TvDCHD1	500 000 à 125 000	250000	0,0%	99,2	N
28/08/14	TvDCHD1	500 000 à 125 000	250000	0,5%	99,3	N
16/06/14	TvDFHD1	500 000 à 125 000	250000	8,8%	95,6	N
26/08/14	TvDFHD1	500 000 à 125 000	250000	0,0%	99,3	N
28/08/14	TvDFHD1	500 000 à 125 000	250000	0,7%	98,7	N
16/06/14	RoDCHD1	500 000 à 125 000	>500000	58,0%	57,0	O
16/06/14	RoDFHD1	500 000 à 125 000	>500000	20,7%	88,7	O
17/09/14	LaDCHD1	500 000 à 125 000	>500000	5825,4%	58,3	O

Annexe 7. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB en µl/L.) des combinaisons contre *Staphylococcus aureus*.

Date	Code	Gammes de concentration	CMB	Viabilité (%)	% d'inhibition - 24H	Croissance sur Agar
18/06/14	TvDCHE1 / LaDCHE1	200 à 50 / 1250 à 312,5	200/1250	12,6%	98,8	N
24/06/14	TvDCHE1 / LaDCHE1	200 à 50 / 1250 à 312,5	200/1250	-0,1%	99,9	N
25/06/14	TvDCHE1 / LaDCHE1	200 à 50 / 1250 à 312,5	200/1250	12,5%	97,6	N
19/06/14	TvDCHE1 / RoDCHE1	200, 200, 100 / 3750 à 937,5	200/1875	6,5%	99,2	N
24/06/14	TvDCHE1 / RoDCHE1	200, 200, 100 / 3750 à 937,5	200/1875	0,7%	98,0	N
25/06/14	TvDCHE1 / RoDCHE1	200, 200, 100 / 3750 à 937,5	200/1875	17,8%	96,7	N
26/08/14	RoDCHE1/LaDCHE1	3750 à 937,5 / 2500 à 625	3750/2500	0,0%	98,8	N
28/08/14	RoDCHE1/LaDCHE1	3750 à 937,5 / 2500 à 625	3750/2500	1,4%	97,6	N
17/09/14	RoDCHE1/LaDCHE1	3750 à 937,5 / 2500 à 625	3750/2500	5,7%	95,8	N
28/08/14	TvDCHE1 / TvCHD1	200 à 50 / 250000 à 62500	100/125000	0,2%	99,7	N
28/08/14	TvDCHE1 / TvCHD1	200 à 50 / 250000 à 62500	100/125000	0,2%	99,8	N
22/09/14	TvDCHE1 / TvCHD1	200 à 50 / 250000 à 62500	100/125000	0,1%	99,3	N

Annexe 8. Concentrations Minimales Fongicides (CMF en µl/L.) des HE et HD contre *Candida albicans.*

Date	Code	Gammes de concentration	CMB	% d'inhibition - 24H	Croissance sur Agar
07/10/14	TvDCHE1	400 à 100	200	100,0	N
08/10/14	TvDCHE1	400 à 100	200	100,0	N
14/10/14	TvDCHE1	400 à 100	200	99,7	N
29/08/14	TvDCHE2	400 à 100	200	99,3	N
06/10/14	TvDCHE2	400 à 100	200	99,8	N
07/10/14	TvDCHE2	400 à 100	200	100,0	N
06/10/14	TvDCHE3	400 à 100	200	100,0	N
07/10/14	TvDCHE3	400 à 100	200	99,8	N
08/10/14	TvDCHE3	400 à 100	200	100,0	N
29/08/14	TvDFHE1	400 à 100	200	98,6	N
06/10/14	TvDFHE1	400 à 100	200	100,0	N
07/10/14	TvDFHE1	400 à 100	200	99,7	N
29/08/14	TvDFHE2	400 à 100	200	100,0	N
06/10/14	TvDFHE2	400 à 100	200	100,0	N
07/10/14	TvDFHE2	400 à 100	200	99,7	N
06/10/14	TvDFHE3	400 à 100	200	100,0	N
07/10/14	TvDFHE3	400 à 100	200	100,0	N
08/10/14	TvDFHE3	400 à 100	200	100,0	N
14/10/14	RoDCHE1	3750 à 937,5	3750	100,0	N
15/10/14	RoDCHE1	3750 à 937,5	3750	99,5	N
16/10/14	RoDCHE1	3750 à 937,5	3750	99,9	N
06/10/14	RoDCHE2	15000 à 3750	3750	99,8	N
07/10/14	RoDCHE2	15000 à 3750	3750	99,4	N
14/10/14	RoDCHE2	3750 à 937,5	3750	100,0	N
07/10/14	RoDCHE3	15000 à 3750	3750	99,8	N
08/10/14	RoDCHE3	7500 à 1875	3750	99,9	N
14/10/14	RoDCHE3	3750 à 937,5	3750	99,9	N
06/10/14	RoDFHE1	7500 à 1875	3750	100,7	N
08/10/14	RoDFHE1	3750 à 937,5	3750	100,0	N
14/10/14	RoDFHE1	3750 à 937,5	3750	100,0	N
06/10/14	RoDFHE2	7500 à 1875	3750	99,9	
07/10/14	RoDFHE2	7500 à 1875	3750	99,4	N
08/10/14	RoDFHE2	3750 à 937,5	3750	100,0	N
08/10/14	RoDFHE3	3750 à 937,5	3750	100,0	N
14/10/14	RoDFHE3	3750 à 937,5	3750	100,0	N
15/10/14	RoDFHE3	3750 à 937,5	3750	99,7	N
14/10/14	LaDCHE1	5000 à 1250	1250	99,8	N
15/10/14	LaDCHE1	5000 à 1250	1250	99,2	N
16/10/14	LaDCHE1	5000 à 1250	1250	100,0	N
08/10/14	TvDCHD1	250000 à 62500	250000	100,0	N
14/10/14	TvDCHD1	250000 à 62500	250000	100,0	N
15/10/14	TvDCHD1	250000 à 62500	250000	100,0	N
07/10/14	TvDFHD1	250000 à 62500	250000	100,0	N
08/10/14	TvDFHD1	250000 à 62500	250000	100,0	N
14/10/14	TvDFHD1	250000 à 62500	250000	100,0	N
06/10/14	RoDCHD1	500000 à 125000	500000	100,0	O
07/10/14	RoDCHD1	500000 à 125000	500000	97,7	N
08/10/14	RoDCHD1	500000 à 125000	500000	100,0	O
06/10/14	RoDFHD1	500000 à 125000	500000	100,0	O
07/10/14	RoDFHD1	500000 à 125000	500000	100,0	O
08/10/14	RoDFHD1	500000 à 125000	500000	100,0	N
06/10/14	LaDCHD1	500000 à 125000	500000	100,0	O
07/10/14	LaDCHD1	500000 à 125000	500000	100,0	O
08/10/14	LaDCHD1	500000 à 125000	500000	100,0	O

Annexe 9. Concentrations Minimales Fongicides (CMF en µl/L.) des combinaisons contre *Candida albicans.*

Date	Code	Gammes de concentration	CMB	% d'inhibition - 24H	Croissance sur Agar
14/10/14	TvDCHE1 / TvDCHD1	200 à 50 / 125000 à 31250	100/62500	100,0	N
15/10/14	TvDCHE1 / TvDCHD1	200 à 50 / 125000 à 31250	100/62500	99,9	N
16/10/14	TvDCHE1 / TvDCHD1	200 à 50 / 125000 à 31250	100/62500	100,0	N
14/10/14	TvDCHE1 / RoDCHE1	200 à 50 / 1875 à 468,75	100/937,5	99,9	N
15/10/14	TvDCHE1 / RoDCHE1	200 à 50 / 3750 à 937,5	100/937,5	98,3	N
16/10/14	TvDCHE1 / RoDCHE1	200 à 50 / 3750 à 937,5	100/937,5	100,0	N
14/10/14	TvDCHE1 / LaDCHE1	200 à 50 / 1250 à 312,5	100/625	99,5	N
15/10/14	TvDCHE1 / LaDCHE1	200 à 50 / 2500 à 625	100/625	99,2	N
16/10/14	TvDCHE1 / LaDCHE1	200 à 50 / 2500 à 625	100/625	100,0	N
14/10/14	RoDCHE1/LaDCHE1	1875 à 468,75 / 1250 à 312,5	937,5/625	99,7	N
15/10/14	RoDCHE1/LaDCHE1	1875 à 468,75 / 1250 à 312,5	937,5/625	99,2	N
16/10/14	RoDCHE1/LaDCHE1	1875 à 468,75 / 1250 à 312,5	937,5/625	100,0	N

Annexe 10. Concentrations Minimales Fongicides (CMF en µl/L.) des HE et HD contre *Aspergillus niger*.

Date	Code	Gammes de concentration	CMF
29/10/14	TvDCHE1	400 à 100	400
05/11/14	TvDCHE1	400 à 100	400
06/11/14	TvDCHE1	400 à 100	400
24/10/14	TvDCHE2	400 à 100	400
07/11/14	TvDCHE2	400 à 100	400
10/11/14	TvDCHE2	400 à 100	400
24/10/14	TvDCHE3	400 à 100	400
07/11/14	TvDCHE3	400 à 100	400
10/11/14	TvDCHE3	400 à 100	400
12/11/14	TvDFHE1	800 à 200	800
19/11/14	TvDFHE1	800 et 400	800
21/11/14	TvDFHE1	800 et 400	800
14/11/14	TvDFHE2	800 et 400	800
19/11/14	TvDFHE2	800 et 400	800
21/11/14	TvDFHE2	800 et 400	800
14/11/14	TvDFHE3	800 et 400	800
19/11/14	TvDFHE3	800 et 400	800
21/11/14	TvDFHE3	800 et 400	800
07/10/14	LaDCHE1	5000 à 1250	5000
05/11/14	LaDCHE1	5000 à 1250	5000
12/11/14	LaDCHE1	5000 à 1250	5000
20/10/14	RoDCHE1	10000, 7500, 5000	10000
29/10/14	RoDCHE1	10000, 7500, 5000	10000
06/11/14	RoDCHE1	10000 et 7500	10000
24/10/14	RoDCHE2	10000, 7500, 5000	10000
06/11/14	RoDCHE2	10000 et 7500	10000
19/11/14	RoDCHE2	10000 et 7500	10000
24/10/14	RoDCHE3	10000, 7500, 5000	10000
06/11/14	RoDCHE3	10000 et 7500	10000
14/11/14	RoDCHE3	10000 et 7500	10000
19/11/14	RoDFHE1	10000 et 7500	10000
20/11/14	RoDFHE1	10000 et 7500	>10000
21/11/14	RoDFHE1	10000 et 7500	10000
24/10/14	RoDFHE2	10000, 7500, 5000	10000
14/11/14	RoDFHE2	10000 et 7500	>10000
20/11/14	RoDFHE2	10000 et 7500	>10000
24/10/14	RoDFHE3	10000, 7500, 5000	10000
14/11/14	RoDFHE3	10000 et 7500	10000
20/11/14	RoDFHE3	10000 et 7500	>10000
15/10/14	TvDCHD1	250000 à 62500	250000
06/11/14	TvDCHD1	250000 à 62500	250000
12/11/14	TvDCHD1	250000 et 125000	250000
15/10/14	TvDFHD1	250000 et 125000	250000
07/11/14	TvDFHD1	250000 et 125000	250000
12/11/14	TvDFHD1	250000 et 125000	250000
15/10/14	RoDCHD1	250000	>250000
15/10/14	RoDFHD1	250000	>250000
15/10/14	LaDCHD1	250000	>250000

Annexe 11. Concentrations Minimales Fongicides (CMF en µl/L.) des combinaisons contre *Aspergillus niger.*

Date	Code	Gammes de concentration	CMF
06/11/14	TvDCHE1/RoDCHE1	400/10000 et 400/7500	400/7500
19/11/14	TvDCHE1/RoDCHE1	400/10000, 400/7500 et 200/7500	400/7500
20/11/14	TvDCHE1/RoDCHE1	400/10000, 400/7500 et 200/7500	400/7500
21/11/14	TvDCHE1/RoDCHE1	400/10000, 400/7500 et 200/7500	400/7500
15/10/14	TvDCHE1/LaDCHE1	200/2500; 100/1250; 50/625	200/2500
05/11/14	TvDCHE1/LaDCHE1	200/2500; 100/1250; 50/625	200/2500
12/11/14	TvDCHE1/LaDCHE1	200/2500; 200/1250; 100/1250	200/2500
06/11/14	RoDCHE1/LaDCHE1	10000/5000; 7500/2500; 5000/1250	7500/2500
12/11/14	RoDCHE1/LaDCHE1	7500/2500; 7500/1250	7500/2500
20/11/14	RoDCHE1/LaDCHE1	7500/2500; 5000/1250	7500/2500
15/10/14	TvDCHE1/TvDCHD1	200/125000	200/125000
06/11/14	TvDCHE1/TvDCHD1	200/125000; 100/62500	200/125000
10/11/14	TvDCHE1/TvDCHD1	200/125000; 100/62500	200/125000

Annexe 12. Liste des activités biologiques des 2 molécules principales de chaque huile essentielle étudiée.

Rosmarinus officinalis		Thymus vulgaris		Lippia alba	
1,8-CINÉOLE	CAMPHRE	THYMOL	PARACYMÈNE	CARVONE	LIMONÈNE
(-)-Chronotropic; 87 nl/ml; HH2;	Allelopathic; 450 CWW;	Acaricide; X10826162;	Analgesic; MAR;	Allergenic; M&R683;	AChE-Inhibitor; 453;
(-)-Inotropic; 87 nl/ml; HH2;	Analgesic; MAR WO2;	Allergenic; M&R366;	Antiacetylcholinesterase; IC40=1.2 mM; JAF45:677;	Antiacetylcholinesterase; IC50=1.4-1.8 mM; JAF45:677;	Acaricide; LC100=8 uM; JAF50:4586;
Acaricide; LC100=6 uM; JAF50:4586 X11124373;	Anesthetic; JE26:74 WO2;	Analgesic; MAD;	Antibacillary; X10826719;	Antiproliferative; JNP65:953;	Allelochemic; JAF45:3276;
Allelopathic; CWW 450;	Antiacne; NIG;	Ancylostomicide; MAD;	Antibacterial; JE26:74;	Antiseptic; 1.5 x phenol; W&W;	Allergenic; 1/20th carene; M&R521;
Allergenic; M&R486;	Antidiarrheic; 500 ug/ml; WO2;	Anesthetic; MAD;	Antiflu;	CNS-Stimulant;	Antiacetylcholinesterase; IC22-26=1.2 mM; JAF45:677;
Anesthetic;	Antidysenteric; 500 ug/ml; WO2;	Ankylostomacide; MAD;	Antirheumatalgic; MAR;	Cancer-Preventive; 525;	Antiadenomic; ACT13:64;
Anthelmintic; JBH;	Antiemetic; 100-200 mg man orl; KCH;	Anthelmintic; 411;	Antiviral;	Candidistat; JNP65:953;	Antialzheimeran?; 453;
Antiacetylcholinesterase; IC50=41 ug/ml; JAF46:3434;	Antifeedant; IC50=5,000 ppm diet; 438;	Antiacne; NIG;	FLavor; FEMA 12-250; ARC;	Carminative; JPP46:16;	Antiasthmatic; X15598576;
Antiallergic; JFH33(6):569;	Antifibrositic; MAR;	Antiaggregant; IC50=0.75; TRA42:511;	Fungicide; TOX;	FLavor; FEMA 80-3,000; ARC;	Antibacterial; RIE12:5;
Antibacterial; 50 ppm; JAR8:2 JEO7:271;	Antineuralgic; MAR;	Antialzheimeran?; LGR;	Herbicide; IC50=50 uM; TOX;	Fungistat; JNP65:953;	Anticancer; AEM401:131;
Antibronchitic; PR14:240;	Antipruritic; M11;	Antiarthritic; MAD;	Insectifuge; HH3;	Insecticide; 382;	Antiesophagitic; ACT13:64;
Anticariogenic; JNP59:823;	Antiseptic; M11;	Antiatherosclerotic; IC50=4 uM; JAF45:578;	Irritant; ZEB;	Insectifuge; 382;	Antifeedant; JAF45:3276;
Anticatarrh; M29;	Antispasmodic; ED50=0.075 mg/ml; FT59:465;	Antibacterial; MIC=50-400 ug/ml; JNP59:823 LAF;	Laxative; ZEB;	Motor-Depressant; BVC:162;	Antiflu; EMP5:195;
Anticholinesterase; IC50=50-70; X12895684 LGR;	CNS-Stimulant; JE26:74;	Antibronchitic; MAD;	Pesticide;	Nematicide; MLC=1 mg/ml; SZ44:183;	Antiinflammatory; X15598576;
Antifatigue; JAR8:2;	Cancer-Preventive; 525;	Anticariogenic; MIC=200-400 ug/ml; JNP59:823;	Sedative; ZEB;	Perfumery; JBH;	Antilithic; M29:1064;
Antihalitosic; AH12(4):17;	Carminative; JPP46:16;	Anticholinesterase; LGR;	Trichomonicide; LD100=50 ug/ml; FT67:279;	Pesticide;	Antilymphomic; X15778119;
Antiinflammatory; EJP331:253;	Convulsant; RJH;	Antihalitosic; AH12(4):17;		Sedative; BVC:162;	Antimetastatic (Stomach); ACT13:64;
Antilaryngitic;	Cosmetic; JBH;	Antiherpetic; MAR;		Trichomonicide; LD100=300 ug/ml; FT67:279;	Antimutagenic; EMP6:235;
Antinociceptive; PR14:401;	Counterirritant; MAR;	Antiinflammatory; (=indomethacin); DFN:161;		Vermicide;	Antiobesity; X15862904;
Antipharyngitic;	Decongestant; NIG;	Antilepric; MAD;			Antiseptic; JAF44:2802;
Antiplaque; X12537346;	Deliriant; M11;	Antimelanomic; IC50=120 uM/l; JN127:668;			Antispasmodic; ED50=0.197 mg/ml; FT59:465;
Antirheumatic; PR14:240;	Ecbolic;	Antineuritic;			Antitumor; AEM401:131 JAF43:2144;
Antirhinitic;	Emetic;	Antioxidant; 100 ppm; MAR;			Antitumor (Breast); AEM401:131;
Antiseptic; JBH;	Epileptigenic; CAN;	Antioxidant (LDL); IC50=4 uM; JAF45:578;			Antitumor (Colon); ACT13:64;
Antisinusitic; PR14:240;	Expectorant; M29;	Antiperiodontic; MIC=50-200 ug/ml; JNP59:823;			Antitumor (Pancreas); AEM401:131;
Antispasmodic; SHT158;	Fungicide; ED50=2.7 mM; TOX;	Antiplaque; MIC=39-625 ug/ml; 451;			Antitumor (Prostate); AEM401:131;
Antistaphylococcic; 50 ppm; JAR8:2;	Herbicide; IC50=3.3-180 mM; 438;	Antiradicular; EC=60; JEO5:153;			Antitumor (Stomach); ACT13:64;
Antitussive; PR14:240 MED'94;	Insect-Repellent;	Antirheumatic; 411;			Antiviral; EMP5:195 LAF;
Antiulcer; X11281182;	Insectifuge; HH3 M11;	Antisalmonella; X11307877;			Apoptotic; X14998133;
CNS-Stimulant;	Irritant; JBH;	Antiseptic; 20 x phenol; W&W;			Bronchoprotectant; X15598576;
Candidicide; LAF337;	Nematicide; MLC=1 mg/ml; SZ44:183;	Antispasmodic; CAN IWU 411;			Cancer-Preventive; 525;
Carcinogenic; ZEB;	Occuloirritant; M&R367;	Antistaphylococcic; JAR10:7;			Candidistat; JAF40:2330;
Choleretic;	P450-2B1-Inhibitor; IC50=7.89 uM; X9242356;	Antistreptococcic; MIC=200-400 ug/ml; JNP59:823;			Chemopreventive; AEM401:131;
Convulsant; JAR8:2;	Pesticide;	Antitrichinosic; 5%; MAD;			Cholesterolytic; X18072821;
Counterirritant; M29;	Respirainhibitor; M11;	Antitussive; IWU;			Detoxicant; BO2 FNF X1438594;
Cytochrome-P450-Inducer; MED'95;	Respirastimulant; KCH;	Ataxigenic; ZEB;			Enterocontractant; JAR4:22;
Decongestant; 1 PR14:240;	Rubefacient; MAR WO2;	Candidicide; 100 ug/ml (>Nystatin); JE58:143;			Expectorant; JBH HH2 TRA;
Degranulant; 0.3 ul/ml; EJP331:253;	Stimulant; RJH;	Carminative; JPP46:16;			FLavor; PJB1(3):242;
Dentifrice; M29;	Transdermal; ZEB X7199340;	Counterirritant; NIG;			Fungiphilic; JAF43:2283;
Edemagenic; inj; PR14:240 EJP331:253;	Verrucolytic; NIG;	Culicide; LC50=36-49 mg/l; X11997977;			Fungistat; JAF40:2330;
Expectorant; JBH;	Vibriocide; 500 ug/ml; WO2;	Cyclooxygenase-Inhibitor; (=indomethacin); DFN:161;			GST-Inducer; X1438594;
FLavor; FEMA 1-200; ARC;		Dentifrice; ARC;			Herbicide; IC50=45 uM; TOX;
Fungicide; SHT158;		Deodorant; MAR;			Histaminic; X15862904;
Gastroprotective; X11281182;		Dermatitigenic; M&R366;			Immunomodulator; X15778119;
Gram(+)icide; JAR8:2;		Enterorelaxant; JAR4:22;			Insecticide; 0.37 uM/fly; JAF50:4576 453;
Gram(-)icide; JAR8:2;		Enterotoxic; WIC;			Insectifuge; 382;
Hepatotonic;		Expectorant; LAF;			Interleukin-6-Inhibitor; X17867636;
Herbicide; IC50=78 uM; TOX;		FLavor; FEMA 2-100; ARC;			Irritant; M11 RIN;
Hypotensive;		Fungicide; M11;			Lipolytic; X15862904;
Inflammatory; inj; EJP331:253;		Gastroirritant; M29;			Myorelaxant; 50 mg/kg; X12587690;
Insectifuge; HH3 382;		Gram(+)icide; MIC=200-400 ug/ml; JNP59:823;			NO-Genic; X15778119;
Irritant; RIN;		Gram(-)icide; MIC=50-200 ug/ml; JNP59:823;			Nematicide; IC=100 ug/ml; NIG;
Myorelaxant; CAN;		Insecticide; 0.22 uM/fly; JAF50:4576;			Ornithine-Decarboxylase-Inhibitor; ~750 mg/kg (diet); BO2;
Nematicide; NIG;		Insecticide; LC50=36-49 mg/l; X11997977;			Ozone-Scavenger; X15598576;
Neurotoxic; JAR8:2;		Insectifuge; X10701181;			P450-Inducer; BO2 FNF;
P450-Inducer; MED'95;		Irritant; LAF;			Peristaltic; X18072821;
Pediculicide; 2.3 x pyrethrin; JAF52:2507;		Larvicide; 10 ppm; 454;			Pesticide;
Perfume; ARC;		Larvicide; 58 ppm; X10701181;			Photosensitizer; RIN;
Pesticide;		Larvicide; LC50=36-49 mg/l; X11997977;			Sedative; ED=1-32 mg/kg; W&W;
Rubefacient; M29;		Molluscicide; PR13:649;			Transdermal; X7199340;
Secretogogue; SHT158;		Myorelaxant; JAR4:22;			
Sedative; JE25:165 ZEB;		Nematicide; MLC=0.1 mg/ml; SZ44:183;			
Spasmogenic; JAR8:2;		Perfumery; ARC;			
Surfactant; SHT158;		Pesticide;			
Testosterone-Hydroxylase-Inducer; MED'95;		Sedative; ZEB;			
Transdermal; X14703969;		Sprout-Inhibitor; PER.COM.SFV;			
Trichomonicide; LD100=1,000 ug/ml; FT67:279;		Tracheorelaxant;			
		Trichomonicide; LD100=25 ug/ml; FT67:279;			
		Urinary-Antiseptic; 411;			
		Varroacide; X10826162;			
		Vermicide; MAD;			

Publications et participation à des congrès

Communications par voie orale:
2nd International Symposium on Medicinal Plants and Natural Products. 3-6/12/2012. Quito (ÉQUATEUR).
Website: http://www.ecuadorishs.org
Tire conférence: Workshop - El Mercado Internacional de Productos Naturales; Riesgos, Oportunidades y Perspectivas de dos empresas latinoamericanas.

3rd International Symposium on Medicinal Plants and Natural Products. 17-19/06/2013. Montréal, Québec (CANADA)
Website: http://www.montrealishs.org/
Tire conférence: Ethical and sustainable practices: challenges for natural products companies

5th International Symposium on Medicinal Plants and Natural Products. 16-18/03/2015. Bogotá (COLOMBIE)
Website: http://phytoessence.org/ISMPNP2015
Observation: J'étais coorganisateur de ce symposium.
Titre conférence: Ethical and sustainable practices: challenges for natural products companies.

Communications par voie d'affiche:
XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines – VII Congreso Colombiano de Cromatografía. Carthagène des Indes (COLOMBIE) 29/09/2013 – 03/10/2013.
Website: http://colacro2014.com
Titre: Actividad antibacteriana y antioxidante de combinaciones de aceites esenciales e hidrolatos

Publications scientifiques:
Yann-Olivier Hay, Miguel Antonio Abril Sierra, Mayra Tellez, Luis G. Sequeda C., *alba* N. Tellez A., Catherine Bonnafous, Christine Raynaud. **Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Parameters of Essential Oils and Hydrosols of Colombian Thyme and Rosemary Obtained Using Two Different Steam Distillation Methods** *International Journal of Phytocosmeticsand Natural Ingredients* 2015; 2:7.

Soumise:
Yann-Olivier Hay, Miguel Antonio Abril Sierra, Mayra Tellez, Luis G. Sequeda C., *alba* N. Tellez A., Catherine Bonnafous, Christine Raynaud. **Antimicrobial and antioxidant activities of combined traditional essential oils and hydrosols**. *Journal of Essential Oil Research*.

RÉSUMÉ

L'industrie parapharmaceutique de même que l'industrie cosmétique recherche des alternatives naturelles aux conservateurs synthétiques. Cet intérêt est lié à l'exigence du consommateur et à la volonté de développer des produits innovants éco-conçus. Compte tenu de leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes, les huiles essentielles constituent des options intéressantes dont les coûts et impacts organoleptiques doivent cependant être considérés. Dans le cadre de cette thèse, les activités antioxydante et antimicrobienne de combinaisons huile essentielle-hydrolat et huile essentielle-huile essentielle de *Lippia alba, Rosmarinus officinalis et Thymus vulgaris* ont été évaluées afin d'objectiver leur potentiel de conservateur pour des produits phytothérapeutiques. Initialement, l'impact d'une méthode de distillation utilisant le macérât aqueux de la matière végétale comme source de vapeur a été évalué sur les propriétés physico-chimiques des hydrolats et huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* cultivées dans le sud de Bogotá en Colombie. Puis, les distillats et hydrolats ayant présenté une activité biologique significative ainsi que l'huile essentielle de *Lippia alba* ont été combinés deux à deux. Les activités antiradicalaire et microbicide ont été évaluées respectivement par ABTS et par les méthodes de microdilution et de diffusion en agar. Des résultats biologiques significatifs ont été obtenus pour les combinaisons huile essentielle-huile essentielle tout spécialement dans le cas de la combinaison des huiles essentielles de *T. vulgaris* et de *L. alba* avec une diminution de la CI_{50} de 2,9 (huile essentielle de Thym seule) à 1,4 µL/L ainsi que dans le cas spécifique de la combinaison hydrolat-huile essentielle de *Thymus vulgaris* avec une CI_{50} de 2,1 µL/L. De même, cette dernière combinaison a présenté un effet de synergie en diminuant la Concentration Minimale Bactéricide de l'huile essentielle de Thym de 0,4 à 0,1 µL/mL. Les différents résultats sont discutés ainsi que leurs impacts d'un point de vue industriel et thérapeutique.

Mots clés: Huile essentielle – hydrolat – conservateur – antioxydant – antimicrobien.

ABSTRACT

The parapharmaceutical industry as well as the cosmetics industry is looking for natural alternatives to synthetic preservatives. This interest is linked to the requirement of the consumer and the will to develop eco-designed innovative products. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils are interesting options, however costs and organoleptic impacts should be considered. As part of this thesis, the antioxidant and antimicrobial activities of essential oil-hydrosol and essential oil-essential oil of *Lippia alba, Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* were evaluated to objectify their preservative potential for herbal products. Initially, the impact of a distillation method using the aqueous macerate of a part of vegetal material as vapor source was evaluated on the physicochemical properties of hydrosols and essential oils of *Thymus vulgaris* and *Rosmarinus officinalis* grown in southern Bogotá Colombia. Then, distillates and hydrosols with significant biological activity as well as the essential oil of *Lippia alba* were combined by pairs. The antiradical and microbicidal activities were evaluated respectively by ABTS and by the methods of microdilution and agar diffusion. Significant results were obtained with the essential oil-essential oil combinations especially in the case of the combination of essential oils of *T. vulgaris* and *L. alba* with a decrease of the IC_{50} of 2,9 (*T. vulgaris* essential oil alone) to 1,4 µL/L as well as in the specific case of the *T. vulgaris* hydrosol and essential oil combination with an IC_{50} of 2,1 µL/L. Similarly, the latter combination presented a synergy effect by decreasing the Minimal Bactericidal Concentration of the essential oil of Thyme from 0,4 to 0,1 µL/mL. The different results are discussed as well as their impacts in both industrial and therapeutic domains.

Keywords: Essential oil – hydrosol – preservative – antioxidant – antimicrobial.