

Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris* L.) en aromathérapie anti-infectieuse

[Potential application of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil as antibacterial drug in aromatherapy]

Mohamed Nadjib Boukhatem¹, Mohamed Amine Ferhat², Abdelkrim Kameli³, Fairouz Saidi¹, Houria Taibi¹, and Teffahi Djamel⁴

¹Departement de Biologie et Physiologie Cellulaire,
Université de Blida 1 / Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,
Route de Soumaa, Blida, Algeria

²Departement de Chimie,
Ecole Normale Supérieure de Kouba,
Vieux-Kouba, Alger, Algeria

³Departement des Sciences Naturelles,
Ecole Normale Supérieure de Kouba,
Vieux-Kouba, Alger, Algeria

⁴Service de Microbiologie Alimentaire,
Laboratoire d'Hygiène de Blida, Algeria

Copyright © 2014 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: To the best of the our knowledge, no methodical reports comparing antibacterial effect (in liquid and vapour phase) of the *Thymus vulgaris* L. essential oil (TVEO) are available. In the present work, we investigated the antibacterial activity of TVEO in order to deduce the opportunity of using TVEO as an antibacterial drug. The extraction of TVEO was obtained by steam distillation. Chemical composition of the TVEO was determined by Gas Chromatography. A total of thirteen compounds were identified. Carvacrol (83.8%) was the major component, followed by cymene (8.15%) and terpinene (4.96%). Antibacterial action of the TVEO against 23 clinically isolated bacterial strains was determined by using agar disc diffusion and vapour diffusion methods at different doses. By disc diffusion method, TVEO showed potent antimicrobial activity against Gram-positive bacteria more than Gram-negative strains and antibiotic discs. The Diameter of Inhibition Zone (DIZ) varied from 25 to 60 mm for *S. aureus*, *B. subtilis* and *E. coli*. However, the results obtained by both agar diffusion and vapour diffusion methods were different. Significantly higher antibacterial effect was observed in the vapour phase at lower doses. *S. aureus* and *B. subtilis* were the most susceptible strains to the oil vapour. Therefore, smaller doses of EO in the vapour phase can be inhibitory to pathogenic bacteria. There is growing evidence that TVEO in vapour phase are effective antiseptic systems and appears worthy to be considered for practical uses in the treatment of human infections or as air decontaminants in hospital. TVEO has considerable antibacterial activity deserving further investigation for clinical applications. Also whilst the mode of action remains mainly undetermined, this experimental approach will need to continue.

KEYWORDS: *Thymus vulgaris*, Antimicrobial drugs, Disc Diffusion, Vapour diffusion, Essential oil, Carvacrol.

RESUME: L'objectif assigné à notre travail consiste à valoriser la fraction aromatique d'une plante médicinale, le Thym (*Thymus vulgaris* L.), en aromathérapie anti-infectieuse. L'extraction de l'essence aromatique de la partie aérienne fraîche de la plante a été effectuée à échelle industrielle par entraînement à la vapeur d'eau. La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle (HE) du Thym, faite par Chromatographie gazeuse-Spectrométrie de masse (CG-SM), a révélé la présence de 13 composés représentant un taux de 85,71%. Le composé majoritaire est le carvacrol avec un taux de (83.8%), suivie par le cymène (8.15%) et / terpinène (4.96%). L'étude de l'activité antibactérienne de l'HE a été accomplie par deux méthodes différentes (Aromatogramme et Microatmosphère), sur un large spectre de souches (7 bactéries à Gram+ et 16 à Gram-). En aromatogramme, la fraction terpénique a présenté une activité antibactérienne modérée sur *S. aureus*, *B. subtilis* et *E. coli* avec des Diamètre des Zones d'Inhibition (DZI) variant entre 25 et 60 mm pour la dose de 20 µL. En microatmosphère, l'HE s'est avérée bactériostatique sur un nombre élevé de germes bactériens. Par conséquent, cette fragrance peut servir au traitement et à la désinfection de l'air dans les hôpitaux. Aussi, les souches *S. aureus* et *B. subtilis* ont manifesté une sensibilité majeure avec une inhibition quasi-totale. L'utilisation de cette essence pour lutter contre les infections bactériennes paraît pleinement justifiée et laissent entrevoir des perspectives d'application dans le domaine pharmaceutique.

MOTS-CLEFS: *Thymus vulgaris*, Antibactériens, Aromatogramme, Microatmosphère, Huile essentielle, Carvacrol.

1 INTRODUCTION

La thérapeutique des infections microbiennes humaines se base principalement sur l'usage des antibiotiques (ATB) et antifongiques. La prescription, à grande échelle, et parfois inappropriée, de ces agents, a entraîné la sélection des souches résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments [1], [2], [3], [4]. Produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles (HE) sont toujours utilisées comme substances aromatisantes en parfumerie, en cosmétique ou comme agents antimicrobiens en médecine populaire, en aromathérapie et en industrie alimentaire [5], [6]. Face au problème soulevé depuis plusieurs années par la résistance des bactéries, la seule alternative fiable à l'usage des ATB semble être celle des HE. Connue de façon empirique depuis des siècles, leur efficacité anti-infectieuse a été scientifiquement démontrée *in vitro* et *in vivo* [7], [8]. De nombreuses études traitent de l'activité antimicrobienne des essences aromatiques, qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès d'aromathérapie scientifique. De nombreux travaux, essentiellement de laboratoire, sont venus renforcer ces résultats, expliquer les modes d'actions de certains de leurs composants. Depuis, l'utilisation de ces molécules terpéniques s'est développée jusqu'à devenir depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médecine des ATB dans les pathologies infectieuses [1], [9].

L'étude de ces essences aromatiques est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels de domaines tels que la pharmacognosie et la microbiologie. Cela tient principalement au fait que le règne végétal est une source présumée inépuisable d'une immense variété de médicaments potentiels, tout en étant accessible, y compris dans les pays en voie de développement. De plus, cette science évolue et s'affine sans cesse avec l'amélioration des instruments d'investigation et de l'accès à l'information scientifique [10]. Cette dernière perspective permet d'élargir le champ de valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM), (autrefois restreint du point de vue économique, à l'extraction de molécules olfactives), par l'exploitation des nombreuses et diverses activités biologiques, substantiellement évoquées par la médecine traditionnelle et corrélées à certains types de structures chimiques [11], [12], [13], [14].

En outre, l'Algérie, de par sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques à laquelle s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement des cultures intensives des PAM. De même, rares sont les cultures des plantes à parfum qui ont fait l'objet d'études scientifiques très approfondies [12] [15]. Malheureusement, le thym, de la famille des Lamiacées, est un exemple éloquent d'espèce qui n'échappe pas à cette règle. Toutes ces considérations nous ont amené à envisager des possibilités de valorisation de la fraction terpénique des thyms odorants en aromathérapie anti-infectieuse, en vue d'offrir une alternative aux ATB. Ce dernier travail fait apparaître des molécules « aromatiques des activités biologique et pharmacologique intéressantes [16], [17], [18], [19].

De ce fait, l'objectif assigné à notre travail consiste à étudier le pouvoir antibactérien de l'essence du Thym, au demeurant très peu exploitée dans les domaines bioactives » issues d'une plante à parfum, le thym (*Thymus vulgaris* L.), référencée par la médecine traditionnelle et supposant ainsi pharmaceutiques et agro-alimentaire malgré ses immenses potentialités thérapeutique et antiseptique [20], [21]. Aussi, plusieurs méthodes microbiologiques et approches techniques ont été examinées lors de cette étude. L'évaluation de l'activité inhibitrice de l'essence en phases liquide (aromatogramme)

et vapeur (microatmosphère) a été effectuée en comparaison avec des ATB. En outre, la composition chimique de l'huile a été déterminée par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM) afin d'établir le profil chromatographique et le chémotype de l'essence de cette plante à parfum.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL ET HUILE ESSENTIELLE

L'huile essentielle de Thym (*Thymus vulgaris*) a été fournie auprès de la société « Extral-Bio® » de production des huiles essentielles et cosmétiques Bio, sise à Chiffa (Blida, Algérie). L'HE a été extraite à partir de la partie aérienne fraîche de la plante (tige et feuilles) au mois de Mai 2012. En outre, l'identification botanique de la plante a été faite antérieurement au niveau du conservatoire du Jardin d'Essais d'El-Hama (Alger). Le procédé d'extraction utilisé est l'entraînement à la vapeur d'eau conduit à échelle industrielle (**Figure 1**). Dans la distillerie Extral-Bio®, les huiles sont extraites, par distillation sous pression à la vapeur d'eau, des feuilles et des branches terminales dans un système classique d'extraction constitué par :

- Un alambic en acier inoxydable, de capacité de 2000 litres, qui comporte une grille pour la matière première ; le chauffage de l'alambic se fait par la vapeur provenant d'une chaudière ;
- Un chapiteau où circule le mélange vapeur eau-essence pour aller vers la partie suivante ;
- Un réfrigérant ou condenseur à serpentin horizontal avec une légère inclinaison ;
- Un essencier ou un vase florentin où l'HE se sépare de l'hydrolat par différence de densité.

Autrement dit, un alambic de 2 m³ de volume utile aurait la capacité de charge de 600 kg de matériel végétal. La vapeur condensée obtenue conduit à deux phases :

- une phase huileuse (HE) qui est séparée de l'eau par simple décantation et à laquelle on ajoute du sulfate de magnésium (MgSO₄) pour éliminer les traces d'eau. La quantité d'HE obtenue est alors pesée pour le calcul du rendement.
- une phase aqueuse (eau aromatique ou hydrolat) qui contient une quantité non négligeable d'essence, soit sous forme solubilisée ou sous forme de fines gouttelettes dispersées.

Aussi, l'HE est certifiée « 100 % naturelle » car n'ayant été additionnée ou mélangée à aucun solvant organique durant la phase de production. Elle est aussi certifiée « Biologique » car provenant d'une culture de Thym où aucuns engrais ou pesticides chimiques n'ont été appliqués durant la phase de culture. L'essence a été conservée dans des flacons stériles teintés, à 4 °C et à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail et ce pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation ou de contamination.

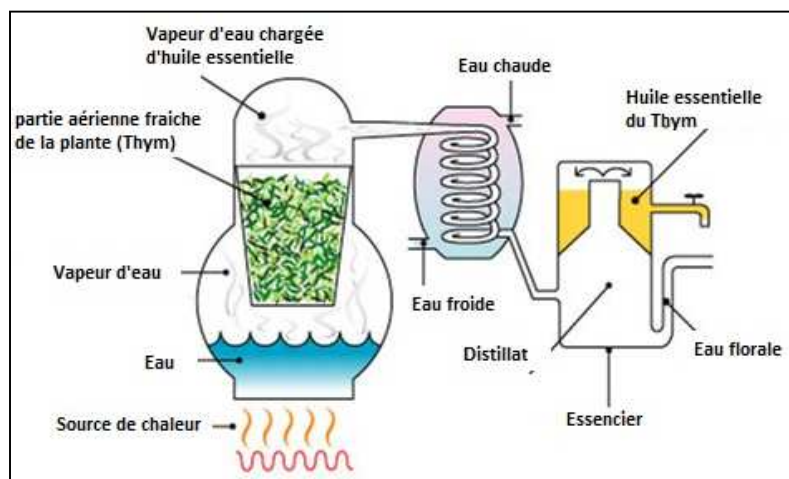


Fig. 1. Schéma de distillation des huiles essentielles à échelle industrielle par entraînement à la vapeur d'eau.

2.2 SOUCHES MICROBIENNES ÉTUDIÉES

Pour mettre en évidence le pouvoir antibactérien de la fraction aromatique distillée du thym, un total de 23 souches microbiennes ont été utilisées (7 bactéries à Gram+ et 16 à Gram-) (**Tableau 1**). Certaines souches sont de référence ATCC (American Type Culture Collection) lors que d'autres ont été isolées cliniquement. Toutes les souches ont été isolées et identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie de l'hôpital de Boufarik et celui du laboratoire d'hygiène de Blida

(Algérie). Ces bactéries ont été conservées et maintenues en vie, par des repiquages continus, sur des milieux de culture adéquats.

Tableau 1 : Souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Souches bactériennes	Origine	Souches bactériennes	Origine
Bactéries à Gram +		Bactéries à Gram -	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa1)	ECBU
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa1)	ECBU	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa2)	ATCC 9027
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa2)	Pus	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa3)	ECBU
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa3)	ECBU	<i>Escherichia coli</i> (Ec1)	ATCC 4157
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa4)	Hémoculture	<i>Escherichia coli</i> (Ec2)	ECBU
<i>Enterococcus</i> sp.	Hémoculture	<i>Escherichia coli</i> (Ec3)	Infection urinaire
<i>Bacillus subtilis</i>	ECBU	<i>Escherichia coli</i> (Ec4)	ECBU
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Kp1)	Pus
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Kp2)	Infection urinaire
		<i>Klebsiella terrigena</i>	ECBU
		<i>Proteus mirabilis</i>	ECBU
		<i>Citrobacter</i> sp.	ECBU
		<i>Serratia</i> sp.	Pus
		<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hémoculture
		<i>Salmonella typhi</i> (St1)	Coproculture des selles
		<i>Salmonella typhi</i> (St2)	Coproculture des selles

ATCC : American Type Culture Collection ; ECBU: Examen cytobactériologique des urines.

2.3 MILIEUX DE CULTURE

Suivant les méthodes employées et selon les souches en question, nous avons utilisé des milieux de culture solides, en l'occurrence la gélose Trypticase Soja Agar (TSA) et Muller-Hinton (MHA) pour les bactéries. Aussi, des milieux de culture sélectifs ont été utilisés (gélose Chapman et gélose Hecktoen). Tous ces milieux de culture proviennent de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA, Alger) et de l'unité Antibiotique de Saidal (Médéa). Et afin de mener une étude comparative du pouvoir antibactérien de l'essence du Thym odorant avec des produits de références, des disques d'Antibiotiques (ATB) (Bio-Rad, France) ont été utilisés comme témoins positifs. Les ATB utilisés sont les suivants : Kanamycine (K, 30 µg), Triméthoprim (TMP, 5 µg), Ticarcilline (TIC, 75 µg), Chloramphénicol (C, 30 µg), Acide Fusidique (FA, 10 µg), Erythromycine (E, 15 µg), Ampicilline (AMP, 10 µg), Ciprofloxacine (CIP, 5 µg), Céfotaxime (CTX, 30 µg), Acide nalidixique (NA, 30 µg), Rifampicine (RA, 5 µg), Imipénème (IMP, 10 µg), Gentamicine (GM, 10 µg), Oxacilline (OX, 5 µg), Céfoxitine (FOX, 30 µg), Vancomycine (VA, 30 µg) et Tétracycline (TE, 30 µg).

2.4 DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE

L'élaboration du profil chromatographique de l'essence aromatique distillée du Thym a été réalisée selon les normes AFNOR (NF ISO 11024-1 : 1999). Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un Chromatographe en Phase Gazeuse (CPG) à régulation électronique de pression, de type Hewlett Packard (série HP 6890, Palo Alto, Californie, USA), équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0.25 mm) avec une épaisseur de film de 0.25 µm, un détecteur FID réglé à 280 °C et un injecteur *split-splitless*. Le mode d'injection est *split*. Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1.7 mL.min⁻¹. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison d'une montée de 2 °C.min⁻¹. L'appareil est piloté par un système informatique de type « HP Chem Station », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques. L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs Indices de Kovats (IK) et sur la Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM). Cette dernière est réalisée sur un CPG de type Hewlett-Packard (série HP 6890) couplé avec un Spectromètre de Masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0.25 mm), l'épaisseur du film est de 0.25 µm. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison de 2 °C.min⁻¹. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1.2 mL.min⁻¹. Le mode d'injection est *split* (rapport de fuite : 1/20). L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse (Wiley7, NIST 2002). L'identification des constituants est basée sur la comparaison de leurs spectres de masse (CG/SM) respectifs avec les spectres de la bibliothèque et de la bibliographie [22] et sur la base de calcul des Indices de Rétention (IR). L'IR d'un composé A est

indépendant du débit, de la longueur de la colonne et de la quantité injectée. L'IR d'un composé A dépend de la phase stationnaire et de la température. Les IR sont calculés comme suit :

$$IR = 100n + \left[\frac{TR_c - TR_n}{TR_{(n+1)} - TR_n} \right] \times 100$$

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

TR_c : Temps de Rétention du composé ;

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

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

2.5 EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE *IN VITRO*

La recherche de l'activité antibactérienne consiste à estimer le degré d'inhibition de la croissance des germes soumis à l'essence aromatique du Thym. Pour cela, deux méthodes qualitatives ont été examinées lors de ce screening antibactérien.

2.5.1 METHODE DE L'AROMATOGRAMME (TECHNIQUE EN MILIEU SOLIDE)

Cette méthode, adoptée par certains auteurs [23], [24], [25], est la technique que nous avons utilisée pour évaluer, dans un premier temps, l'activité antibactérienne de l'HE. Elle est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, l'antibiogramme. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des HE sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte Pétri. Elle nous permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'HE et en déduire ainsi la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cet extrait aromatique. Dans cette méthode (**Figure 2**), nous avons utilisé des disques de 9 mm de diamètre (Antibiotica-Testblattchen, Schleicher & Schuell, D-3354, Dassel, Allemagne). Ces disques sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante. Le disque sera déposé au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche bactérienne. L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des antibiotiques (ATB) par des extraits aromatiques. Dans notre étude, nous avons testé l'activité inhibitrice de l'HE en imprégnant les disques, séparément, par 3 doses croissantes à savoir 20, 40 et 60 µL d'HE par disque. Ceci a été fait dans le but d'apprécier l'action « dose-dépendante » de l'HE sur l'inhibition de la croissance des germes bactériens. De même, la suspension microbienne a été standardisée à 10⁸ UFC.mL⁻¹ (0.5 Mc Farland pour les bactéries) et bien homogénéisée (vortex) avant son ensemencement sur le milieu gélosé adéquat (TSA ou MHA). Chaque boîte Pétri est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à température adéquate (37 °C pendant 24-48h). L'essence diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'essence aromatique suffisante qui inhibe leur croissance. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque et dont le Diamètre de la Zone d'Inhibition (DZI) est mesuré et exprimé en millimètres (mm). Plus le DZI est grand, plus la souche est sensible à l'HE. Ainsi, la souche microbienne sera classée comme étant sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis de l'HE. Aussi et pour chaque souche microbienne, des témoins positifs ont été réalisés en appliquant, dans les mêmes conditions citées précédemment, des disques d'ATB qui vont servir comme référence afin de comparer leur pouvoir antibactérien avec notre échantillon d'HE. A cet effet, plusieurs disques d'ATB ont été utilisés.

2.5.2 METHODE EN PHASE VAPEUR (MICROATMOSPHERE)

Nous avons utilisé cette méthode dans le but d'apprécier les propriétés bactéricide de la phase volatile de l'HE. Cette méthode (**Figure 3**) est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse sont encore peu nombreux [25]. La différence entre cette méthode et l'aromatogramme réside principalement dans la position du disque imprégné. Ce dernier est déposé au centre du couvercle de la boîte Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. De la même manière que l'aromatogramme, nous avons appliqué 3 doses croissantes en HE. En 1^{er} lieu, une quantité de 20 µL d'HE a été déposée sur un disque de papier filtre de 9 mm de diamètre. Dans le 2^{ème} essai, un disque de 20 mm a été imprégné par 40 µL d'HE alors que pour le dernier, un disque de 30 mm a été chargé par 60 µL d'HE. Le diamètre du disque diffère selon la quantité d'HE à imprégner afin d'obtenir un bon étalement et, par conséquent, une meilleure évaporation de l'HE. La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats ont été menés de la même manière que la première méthode (Aromatogramme). La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve à température adéquate. Il se produit alors une évaporation des substances qui, en contact avec les germes ensemencés sur la gélose, va inhiber leur croissance. A la sortie de l'étuve,

l'absence de la croissance bactérienne se traduit par une zone translucide sur la gélose, de contour plus ou moins nette et à tendance circulaire. Une boîte de contrôle, réalisée pour chaque expérience, est une boîte ensemencée dont le disque déposé au centre de la gélose n'est pas imbibé d'HE. Une autre boîte témoin est ensemencée dans les conditions de l'expérience, sans disque. Elle nous renseigne sur l'homogénéité du tapis bactérien.

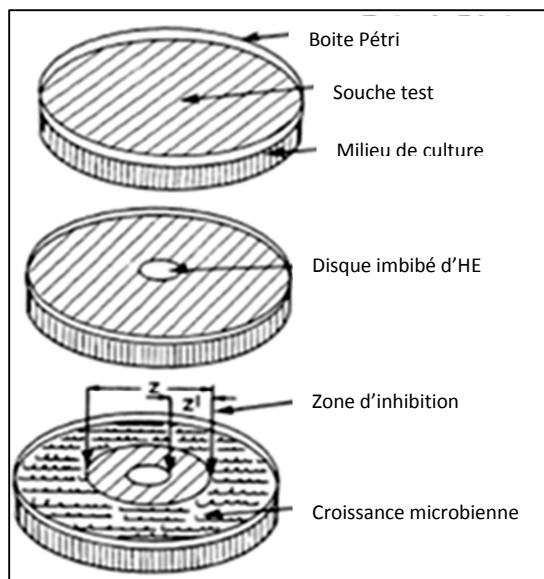


Fig. 2. Illustration de l'aromatogramme [26]

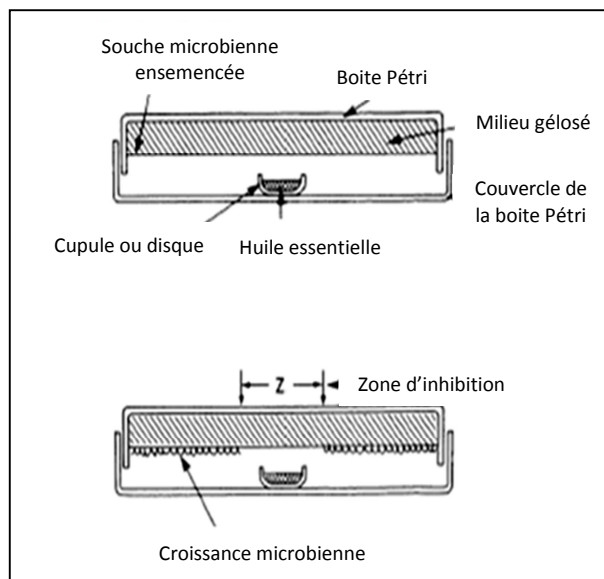


Fig. 3. Illustration de la méthode de Microatmosphère [26]

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 ETUDE ANALYTIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE

3.1.1 CARACTÉRISTIQUES ORGANOLEPTIQUES

Les propriétés organoleptiques et chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Nos essais sont déterminés selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'AFNOR. Les paramètres organoleptiques de notre HE du Thym sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes en vigueur [27] (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Propriétés organoleptiques de l'essence aromatique du Thym

Caractéristiques organoleptiques	Notre étude (2014)	AFNOR [27]
Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile
Couleur	Brun clair	Couleur traditionnellement allant du brun au brun-rouge
Odeur	Caractéristique, aromatique et légèrement épicée	Odeur caractéristique aromatique, phénolique (thymol) avec un fond légèrement épicé

3.1.2 DETERMINATION DU PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE

« Le chemin qui mène de la plante à ses constituants purs est très long » [10]. Cette affirmation démontre, à elle seule, l'importance d'une prise en charge rationnelle du matériel végétal dès qu'il a été sélectionné pour une investigation phytochimique approfondie. L'huile essentielle du Thym, extraite à échelle industrielle par entraînement à la vapeur sous pression, a été analysée d'abord par Chromatographie en Phase Gazeuse avec un Détecteur d'Ionisation à Flamme (CPG-FID) afin de déterminer son profil chromatographique. Pour une identification plus exhaustive des composés aromatiques, l'HE a été analysée par Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC/MS). Les résultats de cette analyse sont consignés dans le **Tableau 3**. Les différents composés ont été listés selon leurs Indices de Rétention (IR). Au total, 13 composés ont été détectés. L'essence aromatique du Thym est composée majoritairement du carvacrol (83.8%). D'autre

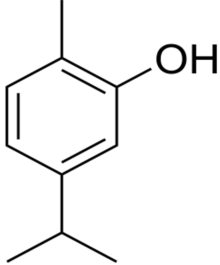
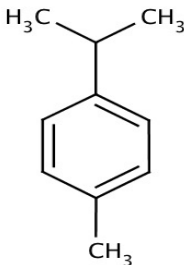
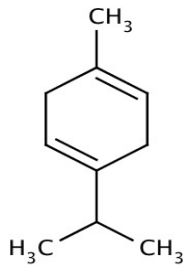
part, la teneur des autres composés varie entre (0.01 – 0.28%) sauf pour *para*-cymène (8.15%), linalool (1.44%) et *gamma*-terpinène (4.96%) (Tableau 4). La composition chimique de l'huile essentielle du Thym révèle que celle-ci est caractérisée par de très fortes teneurs en monoterpènes oxygénés (85.52%) que alors les monoterpènes hydrocarbonés sont présents en faibles quantités (13.5%).

Tableau 3 : Composition chimique de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*.

N°	Composés	%	IR
Monoterpènes hydrocarbonés		13,5	
1	α -Terpinène	0,28	1019
2	<i>p</i> -Cymène	8,15	1028
3	<i>trans</i> -Ocimène	0,11	1052
4	γ -Terpinène	4,96	1065
Monoterpènes Oxygénés		85,52	
5	Linalool	1,44	1123
6	Terpin-4-ol	0,05	1179
7	Thymol	0,23	1302
8	Carvacrol	83,8	1318
Sesquiterpènes		0,13	
9	Aromadendrène	0,06	1439
10	α -Humelène	0,03	1454
11	γ -Cadinène	0,01	1513
12	δ -Cadinène	0,03	1542
Autres composés oxygénés		0,19	
13	Carvacrol méthyle éther	0,19	1282
Composés Oxygénés totaux		85,71	
Composés non Oxygénés totaux		13,63	

EVE : Entraînement à la vapeur d'eau ; RI : Indice de Rétention sur colonne apolaire HP-5MS.

Tableau 4. Structure chimique des composés majoritaires identifiés dans l'essence aromatique du *Thymus vulgaris*.

Structures			
Nomenclatures	Carvacrol	<i>p</i> -cymène	γ -terpinène
Synonymes	2-methyl-5-(propan-2-yl) phenol	4-Isopropyltoluene	4-methyl-1-(1-methylethyl)-1,4-cyclohexadiene
Formules moléculaires	C ₁₀ H ₁₄ O	C ₁₀ H ₁₄	C ₁₀ H ₁₆

Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par plusieurs auteurs [19], [21]. Ces derniers indiquent que l'essence aromatique du Thym odorant présente un taux élevé en phénol. Ils exposent aussi que des monoterpènes hydrocarbonés (*p*-cymène et terpinène) sont également présents avec une quantité appréciable.

Par ailleurs, d'autres résultats sont en totale contradiction avec les nôtres [18], [28]. Des travaux de recherche ont montré que la composition chimique des HE est très fluctuante. En effet, elle dépend d'un grand nombre de facteurs d'ordre naturel (génétique, localisation, maturité, sol et climat) ou technologiques (mode de culture ou d'extraction). Du lieu où poussent les

Lamiacées dépendra la composition biochimique de leur essence et déterminera donc le chémotype, la spécificité de l'huile et les propriétés thérapeutiques. Tous ces paramètres étant influencés par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les pratiques culturales [11], [18], [29]. Toutes ces observations montrent les difficultés que l'on peut rencontrer lors de la préparation et de la conservation des métabolites secondaires volatiles. Aussi, pour assurer la qualité de celles-ci, il est donc nécessaire de définir et de contrôler tous les paramètres depuis la culture du végétal jusqu'à l'obtention du produit final [10].

3.2 SCREENING ANTIBACTÉRIEN DE L'HUILE ESSENTIELLE

L'activité antibactérienne de l'HE du Thym a été réalisée, *in vitro*, sur des souches bactériennes de référence ou isolées cliniquement. Au total, 23 bactéries ont été étudiées (7 à Gram+ et 16 à Gram-). Les résultats de ce screening sont rapportés dans les **Tableau 5**. A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

Tableau 5 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du Thym

Bactéries	Méthodes microbiologiques						Disques d'antibiotiques (ATB)
	Aromatogramme			Microatmosphère			
	Quantité HE (µL/disque)			Quantité HE (µL/disque)			
	20	40	60	20	40	60	
DZI pour les bactéries à Gram -							
<i>E. coli</i> ATCC (Ec1)	30	40	45	55	65	70	C = R; E = R; FA = R
<i>E. coli</i> (Ec2)	32	46	49	50	60	65	K = 14; TIM = R; TIC = R
<i>E. coli</i> (Ec3)	30	45	52	40	43	44	K = 15; TIM = R; TIC = R
<i>E. coli</i> (Ec4)	35	43	53	40	52	70	C = R; E = R; FA = R
<i>K. pneumoniae</i> (Kp1)	32	44	48	31	35	39	TIC = 14 ; AMP = R ; CIP = 40
<i>K. pneumoniae</i> (Kp2)	25	51	53	11	26	29	AMP = R ; CIP = R ; CTX = R
<i>K. terrigena</i>	35	47	50	42	44	50	C = 25; E = 28; FA = R
<i>S. typhi</i> (St1)	33	34	40	33	49	53	C = R; E = R; FA = R
<i>S. typhi</i> (St2)	40	60	69	37	47	50	AMP = 30; CTX = 30; NA = 28
<i>A. baumannii</i>	10	16	16	-	-	-	C = R; E = R; FA = R
<i>P. aeruginosa</i> (Pa1)	-	-	-	-	-	-	C = 10; E = R; FA = R
<i>P. aeruginosa</i> (Pa2)	10	12	12	-	-	-	C = 10; E = R; FA = R
<i>P. aeruginosa</i> (pa3)	-	-	-	-	-	-	RA = 18; IPM = 13 ; GM = 23
<i>Serratia</i> sp.	26	27	27	50	60	65	C = R; E = R; FA = R
<i>Citrobacter</i> sp.	25	35	30	25	27	45	C = 19; E = R; FA = R
<i>P. mirabilis</i>	31	35	39	35	54	56	C = 19; E = R; FA = R
DZI pour les bactéries à Gram +							
<i>S. aureus</i> (ATCC)	60	65	68	53	66	72	TIC = 18; OX = R; FOX = 18
<i>S. aureus</i> (Sa1)	42	43	45	46	54	85	C = 25; E = R; FA = 20
<i>S. aureus</i> (Sa2)	38	68	70	37	45	52	C = 22; E = R; FA = 17
<i>S. aureus</i> (Sa3)	26	27	24	50	60	64	C = 20; E = R; FA = 22
<i>S. aureus</i> (Sa4)	40	60	66	37	47	52	TIC = 20; VA = 19; CIP = 22
<i>Enterococcus</i> sp.	30	35	44	22	36	46	E = 20; TE = R; FA = R
<i>B. subtilis</i>	35	37	45	33	55	70	C = 20; E = 29; FA = 18

(-) Aucune zone d'inhibition ; R : Résistant ; HE : Huile Essentielle ; DZI : Diamètre des Zones d'Inhibition en mm (Diamètre du disque, 9 mm, a été inclus dans le calcul de la DZI). ATCC : American Type Culture Collection ; Les antibiotiques suivants ont été utilisés comme témoins positifs : Kanamycine (K, 30 µg), Triméthoprim (TMP, 5 µg), Ticarcilline (TIC, 75 µg), Chloramphénicol (C, 30 µg), Acide Fusidique (FA, 10 µg), Erythromycine (E, 15 µg), Ampicilline (AMP, 10 µg), Ciprofloxacine (CIP, 5 µg), Céfotaxime (CTX, 30 µg), Acide nalidixique (NA, 30 µg), Rifampicine (RA, 5 µg), Imipénème (IMP, 10 µg), Gentamicine (GM, 10 µg), Oxacilline (OX, 5 µg), Céfoxitine (FOX, 30 µg), Vancomycine (VA, 30 µg) et Tétracycline (TE, 30 µg).

3.2.1 AROMATOGRAMME

L'essence du Thym présente, *in vitro*, une bonne activité inhibitrice sur la croissance de certaines bactéries. En phase liquide, l'HE a exhibé (**Figure 5**) une activité antibactérienne importante notamment sur les bactéries à Gram+ où les DZI oscillent entre 26 et 60 mm pour les disques imprégnés de 20 µL, entre 27 et 68 mm pour le disque imprégné de 40 µL et entre 24 et 70 mm pour un disque imprégné de 60 µL d'HE. Concernant les témoins positifs (disques ATB), les DZI varient selon les espèces. Il est à noter que l'activité bactériostatique de l'HE, à la dose de 20 µL, paraît supérieure à celle des ATB (*S.aureus* (Sa1) = 42 mm vs Chloramphénicol (C, 30 µg) = 25 mm ; *B. subtilis* = 35 mm vs Acide Fusidique (FA, 10 µg) = 18 mm). Les DZI obtenus avec l'HE sont largement supérieurs à ceux obtenus avec les antibiotiques de référence où ils ne dépassent pas, dont les meilleurs des cas, 29 mm. Les bactéries à Gram- ont présenté une certaine inhibition vis-à-vis de l'action antibactérienne de l'essence du thym, mais cette activité demeure inférieure comparativement aux Gram+. *Kesbiella*

terrigena semble être l'espèce la plus sensible avec des DZI de 37, 47 et 50 mm pour les trois doses croissantes utilisées. En revanche, *Pseudomonas aeruginosa* est le germe microbien le plus résistant car aucune inhibition n'a été constatée et ce quelque soit la dose utilisée. Cette résistance n'est pas surprenante et a été confirmée par plusieurs études antérieures [7], [30]. Les bactéries à Gram+ sont les souches les plus sensibles, notamment dans le cas de *Staphylococcus aureus* où les DZI sont comprises entre 24 et 70 mm pour les différentes doses.

Dans le même sillage, nous avons remarqué qu'il y a une certaine différence de sensibilité entre les bactéries à Gram+ et à Gram-. Ceci est en totale adéquation avec la majorité des travaux antérieurs [31]. Ces derniers confirment que les Gram+ sont plus sensibles à l'action antimicrobienne de l'HE que les Gram-. En fait, les Gram- possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne. Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques et acides teichoïques). Par contre chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques). La résistance des bactéries à Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules à franchir la membrane externe. En revanche, de rares publications rapportent qu'il n'existe aucun lien apparent, ni aucune corrélation entre l'activité inhibitrice des essences aromatiques et la nature de la paroi bactérienne [26].

Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par Dorman et Deans [7]. Les auteurs de cette étude ont examiné les activités antibactériennes des HE du poivre noir, du clou de girofle, de la noix de muscade, d'origan et du thym contre 25 bactéries de genres différents. L'objectif était également de tenter de déterminer les composants présents dans les HE susceptibles d'être responsables de leur activité antibactérienne. Les résultats ont confirmé ceux de travaux antérieurs et mis en valeur l'activité antibactérienne de ces HE, y compris celle du Thym. En outre, les auteurs de cette étude n'ont détecté aucune relation entre la nature de la paroi et la sensibilité du germe vis-à-vis des HE.

Dans notre étude, l'activité inhibitrice de l'HE du thym vis-à-vis des souches bactériennes pourrait être due à la présence de plusieurs éléments (carvacrol et terpinène) connus pour leur activité bactéricide. La plupart des composés chimiques des HE sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés inhibitrices les plus importantes, en particulier les phénols [7]. Guarda et al. [32] ont démontré que la nature antimicrobienne des HE est en rapport avec leur fort contenu phénolique en particulier en thymol et carvacrol. Ils ont prouvé que plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles sont efficaces. Pinto et al. [17] ont rapporté que les espèces du genre *Thymus*, qui contiennent une quantité importante en phénols, présentent un large spectre d'activité sur les germes bactériens et fongiques. Le mode d'action du carvacrol a été bien étudié sur *Bacillus cereus*. Ce composé pénètre dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité passive. Chez les bactéries exposées au carvacrol, on observe une diminution de l'ATP intracellulaire, mais aussi une diminution du potentiel membranaire. En plus de limiter la croissance, le carvacrol est capable d'inhiber la production de toxines diarrhéiques chez *B. cereus*. Deux hypothèses ont été présentées : soit l'exportation active des toxines hors de la cellule est impossible à cause du manque d'ATP ou de la diminution de la force motrice, soit le faible taux d'ATP restant est utilisé par la bactérie pour survivre [33]. D'une manière générale, l'action des molécules terpéniques au niveau microbien (**Figure 4**) se déroule en trois phases [5]:

- Attaque de la paroi bactérienne, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'ATP et la synthèse des composants de structure ;
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la cellule bactérienne.

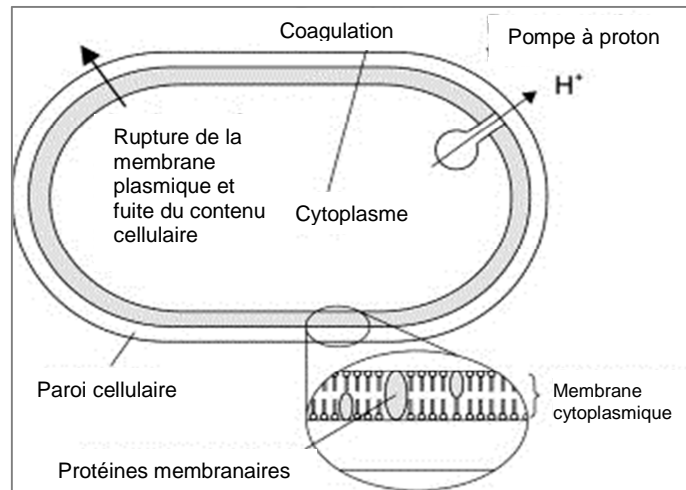


Fig. 4. Mécanisme d'action des huiles essentielles au niveau microbien [5].

Le carvacrol possède aussi un large spectre d'activité, étendu à l'adultération des aliments ou des champignons pathogènes, des levures et des microorganismes pathogènes humains, animaux et végétaux, des biofilms bactériens y compris lors de résistance aux antibiotiques. Cette activité a été attribuée à ses effets considérables sur les propriétés structurales et fonctionnelles de la membrane cytoplasmique [34]. Les cibles préférées du carvacrol sont *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis*. Cependant, les interactions entre les différents constituants d'une huile peuvent également affecter leur activité. Par exemple, l'efficacité de l'HE de Thym contre *S. aureus* et *P. aeruginosa* est due à une synergie entre ses principaux constituants : le carvacrol et le thymol [35]. Une autre interaction synergique a été mise en évidence entre le carvacrol et son précurseur, le *p*-cymène, sur *B. cereus*. Le *p*-cymène semblerait faciliter la pénétration intracellulaire du carvacrol en potentialisant ainsi son action [33]. De cette manière, la valeur d'une HE tient à son "Totum", c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires [36].

Par ailleurs, l'efficacité avérée de la fraction terpénique du Thym odorant en aromathérapie anti-infectieuse a suscité l'intérêt de plusieurs industriels. A cet égard, plusieurs formulations cosmétiques, à visée antiseptique, ont été mises au point et brevetées [37], [38]. D'ores et déjà, ces résultats et autres travaux [8], [20] laissent entrevoir la réalité de l'action anti-infectieuse de la fraction aromatique du Thym.

3.2.2 MICROATMOSPHERE

En phase vapeur, l'HE du Thym s'est avérée très efficace notamment sur les bactéries à Gram+ avec des DZI qui varient entre 22 à 85 mm pour les trois doses utilisées (Figure 5). Les Gram- ont été aussi inhibés mais à un faible degré par rapport aux Gram+. *Pseudomonas aeruginosa* est la souche la plus résistante car aucune zone d'inhibition n'a été détectée. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* sont les espèces qui ont présenté la plus grande sensibilité avec des DZI comprises entre 33 et 55 mm pour la dose de 20 µL, entre 43 et 66 mm pour la dose de 40 µL et entre 44 et 85 mm pour la dose de 60 µL d'HE. A noter que cette action antibactérienne est « dose-dépendante ».

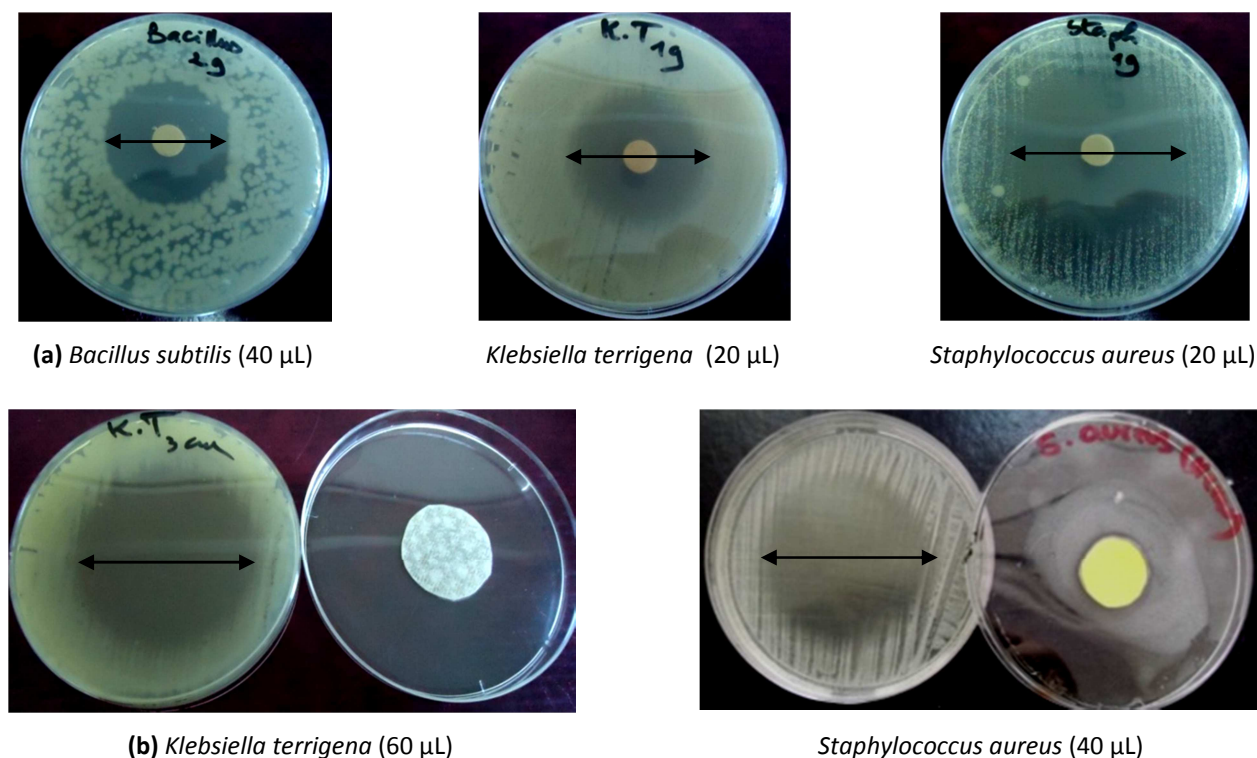


Fig. 5. Effet antibactérien de l'essence aromatique de *Thymus vulgaris* : a) aromatogramme ; b) microatmosphère

Le pouvoir antimicrobien de la phase gazeuse des terpènes n'est pas surprenant du moment que plusieurs travaux ont été publiés en ce sens mais la littérature scientifique reste peu prolifique [23], [24], [39]. A l'heure actuelle, nous pouvons affirmer, sans conteste, qu'il existe des centaines de publications et autres travaux publiés qui mettent en exergue le potentiel antimicrobien des extraits végétaux aromatiques en phase liquide. Cependant, ce nombre ne dépasse pas, au mieux, une vingtaine d'articles de recherche ou revues de synthèse (Review) qui mettent en évidence l'effet bactériostatique de ces produits volatils en microatmosphère. En thérapie, la fraction terpénique du Thym pourra trouver une place comme désinfectant atmosphérique en milieu hospitalier afin de lutter contre les infections nosocomiales et les contaminations aéroportées, ainsi que pour le contrôle de l'hygiène de l'air des systèmes de climatisation, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air. Rappelons pour mémoire que, ancêtres des CLIN hospitaliers modernes (Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales), dès le XVI^e siècle et jusqu'à la fin du XIX^e siècle, ce sont médecins, « parfumeurs et fumigateurs », qui sont chargés de la désinfection des locaux et de l'hygiène hospitalière [13]. En plus de leurs actions bactéricide et fongicide, les essences terpéniques ont la particularité d'avoir des effets psychophysologiques bénéfiques. Bien conduite, la diffusion atmosphérique devient un procédé idéal visant à la protection et à la prévention contre les infections nosocomiales et les pathologies hivernales [39].

3.2.3 ETUDE COMPARATIVE : AROMATOGRAMME VS MICROATMOSPHÈRE

A la lecture comparative entre les résultats obtenus par les deux méthodes, aromatogramme et microatmosphère, il ressort que la différence n'est pas importante en terme d'inhibition pour les souches bactériennes. Cependant quelques exceptions ont été signalées où la phase vapeur est plus active que la phase liquide (**Figure 6**). C'est le cas notamment de *S. aureus* (Sa1) dont le DZI en microatmosphère (85 mm, 60 µL) semble être supérieur à celui de l'aromatogramme (43 mm).

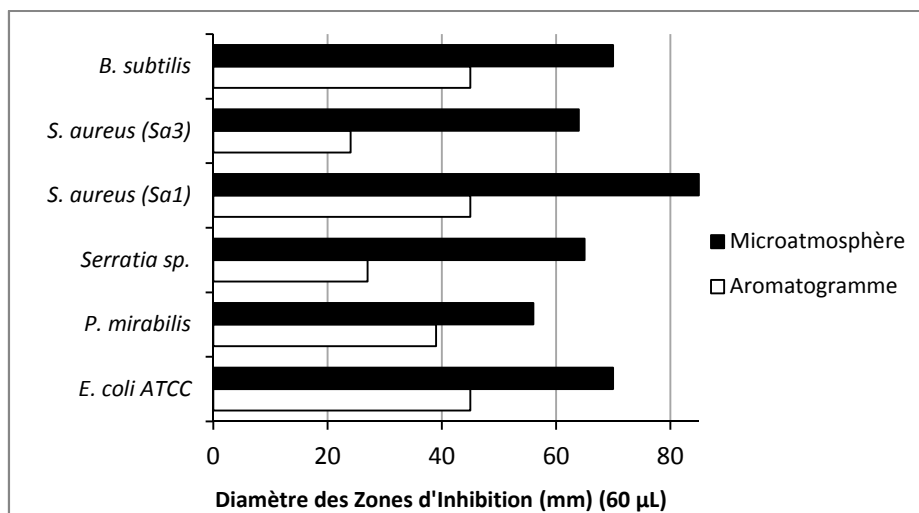


Fig. 6. Etude comparative de l'activité antibactérienne de l'essence du Thym : aromatogramme vs microatmosphère

A la lecture de la littérature scientifique, il apparaît que la microatmosphère est très peu documentée. En effet, rares sont les articles qui traitent de cette méthode. Les études réalisées par Tyagi et Malik [23] et Boukhatem et al. [24] ont mis en exergue la supériorité de l'action inhibitrice de la phase vapeur par rapport à la phase liquide. Ceci a été confirmé notamment sur les Gram+ et les souches fongiques. Cette activité peut s'expliquer par le fait qu'en contact direct, les HE diffusent mal en milieu gélosé à cause de leur non miscibilité et, par conséquent, un contact réduit entre le germe et l'HE. Par contre et en microatmosphère, l'HE est très volatile et, de ce fait, il y aura une bonne diffusion sur une gélose ensemencée préalablement [39], [40]. En revanche et pour d'autres germes bactériens, c'est la phase liquide qui présente une certaine efficacité par rapport à la vapeur, notamment pour la dose de 60 µL par disque. C'est l'exemple de *Salmonella thyphi* (St2) où les DZI notés sont de l'ordre de 69 mm en aromatogramme et de 50 mm en microatmosphère.

4 CONCLUSION

En se basant sur les résultats du screening antibactérien, l'activité inhibitrice de l'essence du Thym pourrait être due à l'effet combinatoire de ses phases vapeur et liquide. Dans tous les cas, cette action inhibitrice de la croissance bactérienne paraît supérieure à celle des ATB utilisés comme référence, notamment pour les bactéries à Gram+. Les résultats obtenus sont très prometteurs pour l'utilisation de la fraction aromatique du Thym, comme principe actif, dans des préparations galéniques à visée antiseptique ou pour lutter contre les infections microbiennes aéroportées. Et afin d'améliorer la compréhension des altérations cellulaires observées, un travail plus approfondi, impliquant les molécules actives majoritaires devra être entrepris. En définitive, l'objectif premier de notre travail a été atteint puisque nous avons contribué à la valorisation de la fraction aromatique du Thym en aromathérapie anti-infectieuse.

REFERENCES

- [1] V. G. De Billerbeck, "Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques," *Phytothérapie*, vol. 5, no. 5, pp. 249-253, 2007.
- [2] P. Thakur, R. Chawla, R. Goel, R. Arora and R. K. Sharma, "In silico modeling for Identification of promising antimicrobials of Herbal origin against highly virulent pathogenic strains of bacteria like New Delhi Metallo-beta-lactamase-1 *Escherichia coli*," *International Journal of Innovation and Applied Studies*, vol. 4, no. 3, pp. 582-592, 2013.
- [3] D. Lawal, J. A. Bala, S. Y. Aliyu and M. A. Huguma, "Phytochemical screening and in vitro antibacterial studies of the ethanolic extract of *Citrus senensis* (Linn.) peel against some clinical bacterial isolates," *International Journal of Innovation and Applied Studies*, vol. 2, no. 2, pp. 138-145, 2013.
- [4] M. Khallaf, N. Ameur, M. Terta, M. Lakranbi, S. Senouci and M. M. Ennaji, "Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat marketed in Rabat, Morocco," *International Journal of Innovation and Applied Studies*, vol. 6, no. 4, pp. 1123-1128, 2014.
- [5] S. Burt, "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, no. 3, pp. 223-253, 2004.
- [6] K. H. C. Baser and G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press, 2010.

- [7] H. J. D. Dorman and S. G. Deans, "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 88, no. 2, pp. 308-316, 2000.
- [8] P. Goetz and K. Ghedira, *Phytothérapie anti-infectieuse*, Springer Science & Business, 2012.
- [9] S. Inouye and S. Abe, "Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse," *Phytothérapie*, vol. 5, no. 1, pp. 2-4, 2007.
- [10] J. Bruneton, *Huiles essentielles. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*, Edition Tec & Doc, Lavoisier, 1999.
- [11] G. Gilly, *Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse: Botanique, Culture, Chimie, Production et Marché*. Edition l'Harmattan, 2005.
- [12] M. N. Boukhatem, F. Saidi, M. S. Hamaidi, Y. Hakim and M. Mekarnia, "Culture et exploitation industrielle du géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) en Algérie: état des lieux et perspectives," *Phytothérapie*, vol. 9, no. 5, pp. 304-309, 2011.
- [13] M. N. Boukhatem, *Fragrance de géranium rosat: Potentielles applications comme conservateur nutraceutique*. Thèse de Doctorat en Sciences, Domaine: Sciences Naturelles, Alger, Algeria, 2014a.
- [14] M. N. Boukhatem, M. A. Ferhat, A. Kameli, and F. Saidi, "Quality assessment of the essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill. of Blida (Algeria) origin," *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, vol. 17, no. 3, pp. 303-315, 2014c.
- [15] M. N. Boukhatem, A. Kameli, M. A. Ferhat, F. Saidi and M. Maamar, "Rose geranium essential oil as a source of new and safe anti-inflammatory drugs," *Libyan Journal of Medicine*, 8: 22520, 2013b.
- [16] E. Stahl-Biskup and F. Sáez, *Thyme: the genus Thymus*, CRC Press, 2003.
- [17] E. Pinto, C. Pina-Vaz, L. Salgueiro, M. J. Gonçalves and J. Martinez-de-Oliveira, "Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 55, no. 10, pp. 1367-1373, 2006.
- [18] M. J. Jordan, R. M. Martinez, K. L. Goodner, E. A. Baldwin and J. A. Sotomayor, "Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition," *Industrial Crops and Products*, vol. 24, no. 3, pp. 253-263, 2006.
- [19] F. C. Fachini-Queiroz, R. Kummer, C. F. Estevao-Silva and R. K. N. Cuman, "Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- [20] B. Imelouane, H. Amhamdi, J. P. Wathelet, M. Ankit, K. Khedid and A. El Bachiri, "Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco," *International Journal of Agriculture and Biology*, vol. 11, no. 2, pp. 205-208, 2009.
- [21] S. Shabnum and M. G. Wagay, "Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses," *Journal of Research and Development*, vol. 11, pp. 83-90, 2011.
- [22] R. P. Adams, *Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Allured Publishing Corporation, 2007.
- [23] A. K. Tyagi and A. Malik, "Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms," *Food Chemistry*, vol. 126, no. 1, pp. 228-235, 2011.
- [24] M. N. Boukhatem, A. Kameli and F. Saidi, "Essential oil of Algerian rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*): Chemical composition and antimicrobial activity against food spoilage pathogens," *Food Control*, vol. 34, no. 1, pp. 208-213, 2013a.
- [25] M. N. Boukhatem, A. Kameli, M. A. Ferhat, F. Saidi and K. Tayebi, "The food preservative potential of essential oils: is lemongrass the answer?," *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Journal of Consumer Protection and Food Safety)*, vol. 9, no. 1, pp. 13-21, 2014b.
- [26] L. L. Zaika, "Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination," *Journal of Food Safety*, vol. 9, no. 2, pp. 97-118, 1988.
- [27] AFNOR (Association Française de Normalisation), *Recueil des Normes Françaises : Huiles Essentielles*, Editions AFNOR, 2000.
- [28] R. Giordani, P. Regli, J. Kaloustian, C. Mikail, L. Abou and H. Portugal, "Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of Amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*", *Phytotherapy Research*, vol. 18, no. 12, pp. 990-995, 2004.
- [29] M. Fadil, A. Farah, B. Hssane, T. Haloui and S. Rachiq, "Application de plan de Plackett Et Burman dans le criblage des paramètres agissants sur le processus d'hydrodistillation de Thym du Maroc (*Thymus vulgaris* L.)," *International Journal of Innovation and Applied Studies*, vol. 6, no. 3, pp. 530-540, 2014.
- [30] K. A. Hammer, C. F. Carson and T. V. Riley, "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 86, no. 6, pp. 985-990, 1999.

- [31] M. Gilles, J. Zhao, M. An and S. Agboola, "Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species," *Food Chemistry*, vol. 119, no. 2, pp. 731-737, 2010.
- [32] A. Guarda, J. F. Rubilar, J. Miltz and M. J. Galotto, "The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 146, no. 2, pp. 144-150, 2011.
- [33] A. Ultee and E. J. Smid, "Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 64, no. 3, pp. 373-378, 2001.
- [34] A. Nostro and T. Papalia, "Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospective," *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, vol. 7, no 1, pp. 28-35, 2012.
- [35] R. J. W. Lambert, P. N. Skandamis, P. J. Coote and G. J. Nychas, "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 91, no. 3, pp. 453-462, 2001.
- [36] M. Lahlou, "Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils," *Phytotherapy Research*, vol. 18, no. 6, pp. 435-448, 2004.
- [37] D. Alli, D. S. Harper, R. M. Parikh and A. Talwar, *Antiseptic dentifrice*. U.S. Patent No. 5,942,211. Patent and Trademark Office, 1999.
- [38] H. B. Jampani, J. L. Newman and T. Ellis, *Antimicrobial composition*, U.S. Patent No. 6,248,343. Patent and Trademark Office, 2001.
- [39] K. Laird and C. Phillips, "Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 54, no. 3, pp. 169-174, 2012.
- [40] M. C. Pibiri, A. Goel, N. Vahekeni and C. A. Roulet, "Indoor air purification and ventilation systems sanitation with essential oils," *International Journal of Aromatherapy*, vol. 16, no. 3, pp. 149-153, 2006.