



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la  
Recherche Scientifique  
Université Abbés Laghrour Khenchela  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie moléculaire et cellulaire



## **Mémoire de fin d'étude**

Pour l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Option: Microbiologie Appliquée

### **Thème**

Mise en évidence de l'activité  
antimicrobienne de l'huile essentielle de  
*Thymus hirtus* willd.

*Présenté par*

GUENIS Chahrazed  
BOUKOULT Soumia

*Devant le jury composé de:*

<b>Président</b>	MAYOUF Nozha	M.C.B	Université Abbes Laghrour Khenchela
<b>Examineur</b>	HANOUN Saida	M.C.B	Université Abbes Laghrour Khenchela
<b>Encadreur</b>	BERTELLA Anis	M.C.B	Université Abbes Laghrour Khenchela

Année universitaire 2020/2021

# REMERCIEMENTS

*Nous remercions tout d'abord Dieu le tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné courage, force et volonté pour réaliser ce travail.*

اللهم لك الحمد لجلال وجهك وعظيم سلطانك

*Il est difficile d'énumérer toutes les personnes de près ou de loin, qui n'ont cessé de témoigner leur soutien moral ou matériel à notre égard.*

*Tout d'abord, nous exprimons notre profonde reconnaissance et toute notre gratitude à notre encadreur **Dr BERTELLA Anis**, pour l'aide et le suivi qu'il nous a fournis tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Merci pour vos conseils et orientations qui nous ont permis de mener à bien cette passionnante étude à vos côtés.*

*Nos vifs remerciements à tout le staff du laboratoire de l'**Université Abbés Laghrour Khenchela « El Hamma »**, sous la direction de madame **Chorfi**, pour la fourniture de tous les moyens et conditions appropriés pour bien réaliser ce travail.*

*Je tiens à remercier tout spécialement : **HANOUN Saida***

***MAYOUF Nozha**, pour m'avoir honoré en acceptant d'examiner ce travail.*

*A nos collègues : **Bounzera Yasmina, Menai Asma**, nous souhaitons bon courage pour la fin de leurs études.*

*Nous profitons aussi de cette occasion pour adresser nos remerciements à nos parents pour leurs sacrifices et à tous nos chères.*

*Nous remercions enfin tous ceux qui n'ont pas été cités dans ces quelques lignes et qui ont contribué de près ou de loin par leur aide au bon déroulement de ce travail.*

# DÉDICACES

*Nous dédions ce modeste travail à tous ceux qui nous ont enseigné durant toutes ces années, et qui nous ont encouragés tout au long de notre parcours en Microbiologie.*

***A tous ceux qui nous sont chers***

***À nos parents***

***À nos familles***

***À nos amis***

## Résumé

Les activités biologiques des huiles essentielles sont devenues très importantes et continuent à faire l'objet de différentes recherches scientifiques, surtout avec l'utilisation des antibiotiques qui a conduit à la résistance des bactéries.

L'objectif de ce travail est l'extraction de l'HE de la plante *Thymus hirtus* Willd. et mettre en évidence son pouvoir antimicrobien.

L'extraction de l'HE de la plante *T.hirtus* collectée de la région de Batna pendant la période printanière, a été assurée par l'hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger modifié. Le rendement de l'extraction par hydrodistillation a été faible avec un taux de 1.14%.

L'étude de l'activité antibactérienne et antifongique a été réalisée par la méthode de l'aromatogramme sur les souches bactériennes d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Entérocooccus sp* avec une zone d'inhibition allant jusqu'à 14 mm, ainsi que sur les souches fongiques d'*Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus* et *Fusarium oxysporum* avec une zone d'inhibition ne dépassant pas 10 mm.

La détermination de la CMI et la CMB a été faible pour les souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Ces valeurs signifient une très bonne activité.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de l'HE de TH qui est d'une intensité modérée à faible.

**Mots clés :** Huile essentielle, *Thymus hirtus* Willd., hydrodistillation, activité antimicrobienne, aromatoigramme.

## **Abstract**

The biological activities of essential oils have become very important and continue to be the subject of different scientific researches, especially with the use of antibiotics which has led to the resistance of bacteria.

The objective of this work is the extraction of EO from the plant *Thymus hirtus* Willd. and highlight its antimicrobial activity.

The extraction of EO from the plant *T. hirtus* collected from the region of during the spring period was carried out by hydrodistillation using a modified Clevenger-type apparatus. The hydrodistillation extraction yield was low with a rate of 0.02%.

The study of antibacterial and antifungal activity was carried out by the aromatogramm method on bacterial strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus* sp with an inhibition zones up to 14 mm, as well as on fungal strains of *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysprum* with an inhibition zone that does not exceed 10 mm.

The determination revealed a good activity of TH EO for the strains of *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp.

The results obtained demonstrate the antimicrobial effect of TH EO, wich is moderate to low intensity.

**Keywords :** Essential oil, *Thymus hirtus* Willd., Hydrodistillation, antimicrobial activity and aromatogram.

البيولوجية للزيوت الأساسية مهمة للغاية  
الحيوية البكتيريا لها.  
الهدف هذا هو الزيت الاساسي  
علمي *Thymus hirtus willd* وتسليط قوته  
الزيت الاساسي *T.hirtus* جمعه  
طريق التقطير الربيع بالتقطير حيث  
جهاز Clevenger .  
الزيت الناتج : 1.14 % .  
أجريت للبكتيريا والفطريات بطريقة التصوير العطري باستخدام اوراق الترشيح  
البكتيرية التالي : *Escherichia coli, Staphylococcus Pseudomonas aeruginosa , Entérococcus sp*  
*Klebsiella pneumoniae aureus,* تثبيط 14 الفطرية  
التالية: *Aspergillus fumigatus, Fusarium oxysprum Aspergillus terreus* أين تثبيط  
. 10  
تحديد CMB MIC ضعيفا هذه *Staphylococcus aureus Escherichia coli*  
القيم جيدًا .  
عليها TH للميكروبات للزيت

الكلمات المفتاحية: زيت عطري، التقطير نبات الجرتيل (الحمرية) لميكروبات التصوير .

# *Table des matières*

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale.....01

## **Partie théorique : Revue bibliographique**

### **Chapitre 1 : Généralités sur les huiles essentielles**

1. Historique .....	03
2. Définition d'une huile essentielle .....	03
3. Biosynthèse des huiles essentielles chez les plantes .....	03
3.1. Les cellules sécrétrices isolées .....	04
3.2. Les poils sécréteurs.....	05
3.3. Les poches sécrétrices .....	05
3.4. Les canaux sécréteurs .....	06
4. Caractérisation et Propriétés physicochimique des huiles essentielles .....	06
4.1. La température .....	06
4.2. La volatilité .....	06
4.3. La solubilité .....	06
4.4. La couleur .....	07
4.5. La densité .....	07
4.6. L'indice de réfraction .....	07
4.7. Le pouvoir rotatoire .....	08
5. Composition chimique des huiles essentielles .....	08
6. Extraction des huiles essentielles .....	09
6.1. Hydrodistillation de type Clevenger .....	09
6.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau .....	10
6.3. L'expression à froid .....	11
6.4. Extraction par micro-ondes .....	12
6.5. Extractions au CO2 supercritique .....	12
7. Le rôle des huiles essentielles chez les plantes .....	13
8. Domaines d'utilisation des huiles essentielles .....	14
8.1. En industries alimentaire .....	14
8.2. En pharmacologie (Domaines thérapeutiques) .....	14

8.3. En parfumerie et cosmétique .....	14
9. Toxicité des huiles essentielles .....	15

## **Chapitre 2 : Monographie de l'espèce *Thymus hirtus* willd.**

1. Classification .....	16
2. La famille des Lamiacées.....	16
3. Le genre <i>Thymus</i> .....	18
3.1. Historique « Origine du nom » .....	18
3.2. Variabilité et origine.....	18
3.4. Répartition géographique .....	18
3.4.1. Dans le monde .....	18
3.4.2. En Algérie .....	19
4. L'espèce <i>Thymus hirtus</i> willd. ....	20
4.1. Nom scientifique .....	20
4.2. Noms vernaculaires .....	21
4.3. Description morphologique.....	21
4.4. Composition chimique de <i>Thymus hirtus</i> willd.....	22
4.5. Localisation en huile essentielle.....	22
4.6. Rendement de la plante TH.....	23
4.7. Caractérisation organoleptiques de l'HE.....	23
4.8. L'usage de <i>thymus hirtus</i> willd.....	23

## **Chapitre 3 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles**

1. Les huiles essentielles en tant qu'antimicrobiens.....	24
2. Mode d'action des HEs.....	25
3. Activité liée au microorganisme.....	26
4. Propriétés antibactériennes des HEs.....	28
5. Propriétés antifongiques des HEs.....	29
6. Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne des HEs.....	29
6.1. Méthodes qualitatives.....	29
6.1.1. La méthode de l'aromatogramme.....	29
6.1.2. La méthode de micro-atmosphère .....	31
6.2. Méthodes quantitatives.....	32
6.2.1. La méthode des CMI.....	32
6.2.2. La méthode des CMB.....	32

## **Partie pratique**

### **Chapitre 1 : Matériel et méthodes**

1. Matériel végétal.....	33
1.1. Identification botanique de la plante.....	33
1.2. Préparation du matériel végétal.....	33
1.2.1. Collecte de la plante.....	33
1.2.2. Séchage .....	35
1.2.3. Broyage.....	35
2. Extraction de l'HE du <i>Thymus hirtus</i> Willd. ....	35
2.1. Procédé d'hydro-distillation.....	35
2.1. Récupération et conservation de l'HE.....	36
2.2. Détermination du rendement.....	37
3. Activité antimicrobienne .....	37
3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne .....	37
3.1.1. Souches bactériennes .....	37
3.1.2. Antibiogramme.....	38
3.1.3. Repiquage des souches bactériennes.....	40
3.1.4. Méthode de diffusion sur disque (l'aromatogramme) .....	41
3.1.4.1. Le choix de milieu de culture.....	41
3.1.4.2. Préparation de suspensions bactériennes.....	42
3.1.4.3. Ensemencement .....	42
3.1.4.4. Préparation des disques .....	43
3.1.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	43
3.1.6. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	44
3.2. Evaluation de l'activité antifongique.....	44
3.2.1. Souches fongiques.....	44
3.2.2. Le choix de milieu de culture.....	45
3.2.3. Repiquage des souches fongiques.....	45
3.2.4. Préparation de suspensions fongiques.....	46
3.2.5. Méthode de diffusion sur disque (L'aromatogramme) .....	47

### **Chapitre 2 : Résultats et discussion**

1. Résultats et interprétation.....	48
1.1. Résultats de l'activité antimicrobienne.....	48

1.1.1. Résultats de l'activité antibactérienne.....	48
1.1.1.1. L'aromatogramme .....	48
1.1.1.2. Détermination de la CMI.....	50
1.1.1.3. Détermination de la CMB.....	51
1.1.2. Résultats de l'activité antifongique.....	51
1.1.2.1. L'aromatogramme .....	51
2. Discussion .....	54
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>57</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>58</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>70</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : La classification botanique de <i>Thymus hirtus</i> willd.....	16
<b>Tableau 2</b> : les principales espèces de Thymus en Algérie.....	20
<b>Tableau 3</b> : Généralités sur quelques souches bactériennes.....	27
<b>Tableau 4</b> : les souches bactériennes utilisées.....	38
<b>Tableau 5</b> : Diamètres des zones d'inhibition (mm) par antibiogramme des souches bactériennes testées.....	39
<b>Tableau 6</b> : les micro-dilutions successives en milieu liquide pour la réalisation de la CMI.....	44
<b>Tableau 7</b> : les souches fongiques utilisées.....	45
<b>Tableau 8</b> : Zones d'inhibition de l'HE de TH des souches bactériennes testées.....	48
<b>Tableau 9</b> : Résultats de la CMI des cinq souches bactériennes testées.....	50
<b>Tableau 10</b> : Résultats de la CMB des souches bactériennes testées.....	51
<b>Tableau 11</b> : Diamètre des zones d'inhibition des souches fongiques testées.....	52

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Un exemple d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes.....	04
<b>Figure 2</b> : Glande sécrétrice chargée d'huile essentielle d'une fleur de lavande.....	04
<b>Figure 3</b> : poil sécréteur d'une feuille de thym.....	05
<b>Figure 4</b> : Détail d'une poche sécrétrice et d'un cristal d'oxalate de calcium.....	05
<b>Figure 5</b> : Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger.....	10
<b>Figure 6</b> : Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.....	11
<b>Figure 7</b> : Extraction par micro-ondes.....	12
<b>Figure 8</b> : Extraction au CO <sub>2</sub> supercritique.....	13
<b>Figure 9</b> : Répartition mondiale des lamiacées.....	17
<b>Figure 10</b> : Photos de la famille des Lamiaceae. ....	17
<b>Figure 11</b> : la distribution géographique de thym dans le monde (Le cercle noir représente la zone de distribution du genre <i>Thymus</i> dans le monde) .....	19
<b>Figure 12</b> : la répartition géographique de deux thyms dans l'Algérie. ....	20
<b>Figure 13</b> : La plante de <i>Thymus hirtus</i> Willd. ....	21
<b>Figure 14</b> : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne..	26
<b>Figure 15</b> : schéma représentant les différents sites d'action des huiles essentielles au niveau d'une cellule bactérienne.....	28
<b>Figure 16</b> : illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri.....	30
<b>Figure 17</b> : Exemple d'aromatogramme.....	31
<b>Figure 18</b> : illustration de la méthode des micro-atmosphères.....	31
<b>Figure 19</b> : Zone d'échantillonnage.....	33
<b>Figure 20</b> : schéma de la Préparation du matériel végétal.....	34
<b>Figure 21</b> : Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger modifié.....	36
<b>Figure 22</b> : Conservation de l'HE du TH extraite.....	36
<b>Figure 23</b> : Zones d'inhibition par antibiogramme des souches bactériennes.....	40
<b>Figure 24</b> : Repiquage des souches bactériennes.....	41
<b>Figure 25</b> : préparation de milieu MH.....	41
<b>Figure 26</b> : Préparation de suspensions bactériennes.....	42
<b>Figure 27</b> : Ensemencement des souches bactériennes sur milieu gélosé (MH). ....	42
<b>Figure 28</b> : Préparation des disques.....	43
<b>Figure 29</b> : préparation de milieu Sabouraud (SAB).....	45
<b>Figure 30</b> : Repiquage des souches fongiques .....	46

<b>Figure 31</b> : Tubes contenant des solutions fongiques jeunes.....	45
<b>Figure 32</b> : Zone d'inhibition de la croissance bactérienne d' <i>E.coli</i> par l'HE de TH .....	49
<b>Figure 33</b> : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne des souches bactériennes testées.....	49
<b>Figure 34</b> : Histogramme de la CMI des cinq souches bactériennes testées.....	50
<b>Figure 35</b> : Histogramme des diamètres de zones d'inhibition de croissance fongiques des souches testées.....	52
<b>Figure 36</b> : Zone d'inhibition des souches fongiques testées.....	53

## Liste des abréviations

**%** : pourcent

**[C]** : concentration

**°C** : degré Celsius

**±** : Plus ou moins

**AF** : *Aspergillus fumigatus*

**AT** : *Aspergillus terreus*

**ATP** : Adénosine triphosphate

**ATB** : Antibiotique

**C** : Carbone

**Cm** : centimètre

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CML** : Concentration Minimale Létale

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone

**D** : Diamètre

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**EC** : *Escherichia coli*

**Entéro** : *Entérocooccus sp*

**EO** : Essential Oil

**FOX** : *Fusarium oxysporum*

**GN** : Gélose Nutritive

**Gram -** : Gram négatif

**Gram +** : Gram positif

**G** : gramme

**h** : heure

**HE** : Huile Essentielle

**HEs** : Huiles Essentielles

**H** : Hydrogène

**J** : Jours

**KP** : *Klebsiella pneumoniae*

**L** : litre

**m** : masse

**Max** : maximum  
**Mg** : milligramme  
**MgSO<sub>4</sub>** : sulfate de magnésium  
**MH** : Mueller Hinton  
**min** : minute  
**μL** : Microlitre  
**ml** : millilitre  
**mm** : millimètre  
**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Sulfate de Sodium  
**NaCl** : Chlorure de sodium  
**N** : Nord  
**O** : Oxygène  
**PA** : *Pseudomonas aeruginosa*  
**pH** : potentiel d'hydrogène  
**R** : Radical  
**R** : Résistante  
**S** : Sensible  
**SA** : *Staphylococcus aureus*  
**SAB** : Sabouraud  
**t** : temps  
**T** : Témoin  
**TH** : *thymus hirtus*  
**TTC** : Chlorure de tétrazolium  
**V** : volume  
**UV** : ultra-violet

# *Introduction*

## *Introduction*

Il y a un intérêt croissant pour les remèdes alternatifs, y compris la thérapie utilisant des produits naturels, en particulier ceux dérivés de plantes (Ksouri et al., 2017), ces dernières ont été examinées pour leurs utilisations potentielles en tant que remèdes alternatifs pour le traitement de diverses maladies causées par le stress oxydatif, les infections bactériennes, fongiques et virales ; et pour la préservation des aliments contre l'oxydation et la contamination microbienne (Krimat et al., 2015).

L'exploitation du potentiel chimique des plantes passe d'abord par une première étape d'extraction des composés spécifiques d'espèces botaniques sélectionnées (Lahlou., 2004). Malheureusement ces molécules aromatiques, souvent à forte valeur ajoutée, sont présentes dans ces espèces en faible quantité, c'est le cas des huiles essentielles extraites des plantes aromatique et médicinale (Richter et al., 2007).

L'étude de ces essences est toujours d'une importante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels des 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 (Rahman et al., 2016).

Les huiles essentielles sont généralement connues comme composés non toxiques ayant une activité potentielle contre les microorganismes, sauf lorsqu'elles sont mal utilisées. Cette toxicité serait liée à la dose administrée, où elles peuvent en conséquence avoir un effet nocif même sur la santé humaine (Rahman et al., 2016).

L'Algérie grâce à sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques à laquelle s'ajoutent les ressources hydriques favorables au développement des cultures intensives des plantes aromatiques et médicinales.

Le *Thymus*, de la famille des Lamiacées, est un exemple éloquent d'espèce qui n'échappe pas à cette règle. Ce genre a plusieurs espèces largement réparties dans la zone méditerranéenne ; et comprend environ 100 espèces (Nouasri et al., 2015). De nombreuses espèces de thymus sont utilisées dans diverses régions mondiales dans le traitement des affections bronchiques, pulmonaires, digestives, et les infections urinaires et possèdent des propriétés spasmolytiques, antiseptiques, et les propriétés d'attente. Plus de 11 espèces de ce genre poussent en Algérie (Laouer et al., 2006), parmi lesquels *Thymus hirtus* willd. (El hamriya) et *Thymus lanceolatus* Desf. (Thym du manteau) sont les plus courantes (Quezel et Santa, 1963).

Toutes ces constatations nous ont donné l'idée d'étudier l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle de la plante *Thymus hirtus* Willd. poussant en Algérie.

Mais les études sur cette plante restent très limitées. De ce fait, nous avons voulu étudier l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus hirtus* - Willd. dans le but d'une éventuelle utilisation dans le domaine médical en vue d'offrir une alternative aux ATB.

Notre étude vise deux objectifs qui sont l'extraction des essences aromatiques du *thymus hirtus* récolté à partir d'un champ de culture et l'évaluation de l'efficacité antibactérienne et antifongique des dites molécules aromatiques in vitro vis - à - vis des souches microbiennes, standardisées ou isolées cliniquement par deux méthodes complémentaires (méthode des disques et méthodes des puits).

Ce mémoire est structuré en deux parties :

La première partie : est une synthèse bibliographique comprenant trois chapitres, le premier englobe des généralités sur des huiles essentielles, le deuxième recense l'espèce *Thymus hirtus* Willd. et le troisième présente l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.

La seconde partie : est la partie pratique qui est consacrée à la :

- Description des produits, du matériel et des différentes méthodes utilisés pour extraire et caractériser l'huile essentielle du thymus, ainsi qu'une évaluation de l'activité antimicrobienne de cette huile essentielle.
- Présentation des résultats de l'expérimentation, et l'interprétation de ceux-ci en se basant sur des références bibliographiques et certaines recherches précédentes. Enfin, une conclusion générale résumant l'ensemble des résultats obtenus et révélant les principales perspectives.

# ***Partie théorique***

Revue bibliographique

# *Chapitre 1*

## *Généralités sur les huiles essentielles*

## 1. Historique

Dans l'antiquité, 4000 ans avant JC, les aborigènes australiens faisaient des fumigations avec la plante d'arbre à thé (Delaigne, 1930).

Différentes civilisations ont utilisé les huiles essentielles depuis 7000 ans avant JC jusqu'à 1000 ans avant JC : l'Inde, le Pakistan, la Chine, l'Égypte, la Grèce... etc (Friedland, 1975). C'est au moyen âge que fut la première extraction de l'huile essentielle par Avicenne, il s'agit de l'huile essentielle de Rose (*Rose centifolia*) (Friedland, 1975).

Les arômes et les parfums furent parmi les premiers signes de la reconnaissance qui marquèrent la vie de l'homme (Delaigne, 1930).

Les huiles essentielles étaient importantes et fondamentales à l'industrie des arômes, bien qu'on connaisse plus de 3000 essences, que 150 qui sont commercialement importantes (Friedland, 1975).

Au 17<sup>ème</sup> siècle, un mélange des huiles essentielles : sauge, basilic, romarin, ail, menthe, cannelle, muscade, camphre et rue officinale, a été utilisé comme antiseptique.

Après la découverte des antibiotiques, l'utilisation des huiles essentielles a beaucoup diminué. L'utilisation des antibiotiques a engendré de nombreuses résistances, sélection de bactéries encore plus pathogènes et destruction du microbiote, par contre l'utilisation des huiles essentielles ne provoque aucune résistance et protège la flore commensale tout en détruisant les bactéries pathogènes (Franchomme al., 2004).

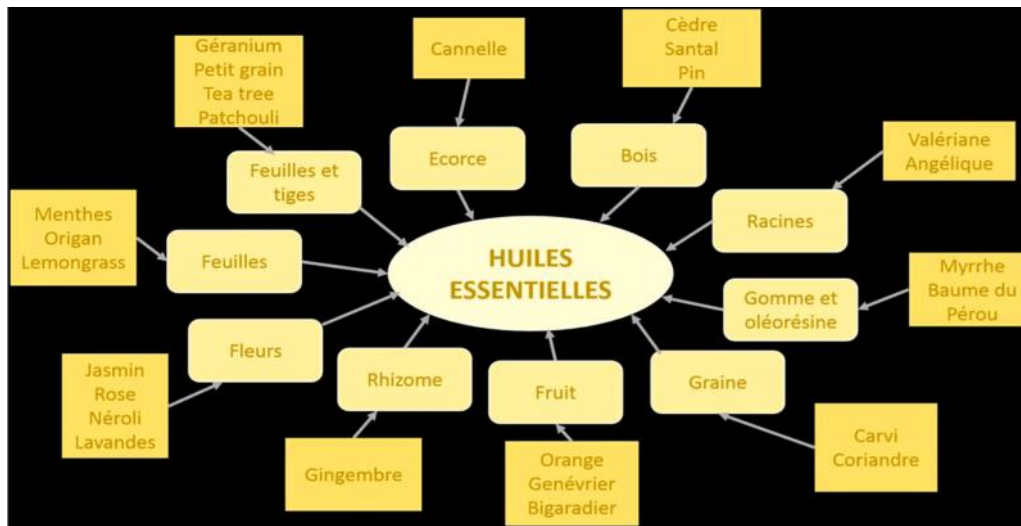
## 2. Définition d'une huile essentielle

L'huile essentielle est une substance fluide épaisse odoriférante obtenue à partir d'une plante botaniquement définie (Conner, 1993).

Elle est extraite à partir des feuilles (menthe, basilic), les fleurs (lavande, ylang ylang), écorce de bois (cèdre, santal blanc), les racines (gingembre, valériane, vétiver), les graines (sésame, anis) (Conner, 1993).

Son extraction se fait soit par hydro distillation, par entraînement à la vapeur ou par expression mécanique sans chauffage (AFNOR, 2000).

## 3. Biosynthèse des huiles essentielles chez les plantes



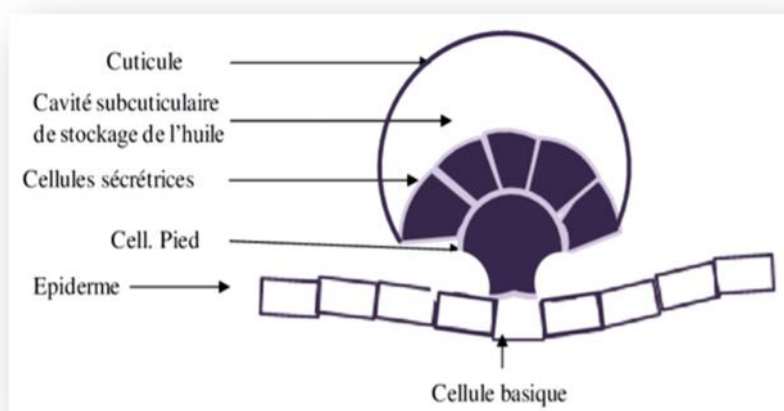
**Figure1** : Un exemple d’huiles essentielles issues de différentes parties de plantes (Svoboda et al.,2000).

La synthèse des huiles essentielles est réalisée dans différents tissus sécréteurs des organes de la plante telles que: les fleurs, les feuilles, mais aussi dans des écorces des bois, des racines, des fruits, ou encore des graines. Ces tissus peuvent également produire des résines, de composition chimique proche des huiles essentielles et également insolubles dans l’eau, mais non volatiles (Svoboda et al., 2000).

On retrouve quatre structures sécrétrices :

**3.1. Les cellules sécrétrices isolées**

Ces cellules peuvent se retrouver dans tous les tissus de la plante mais elles sont plus fréquentes au niveau de l’épiderme, surtout au niveau des feuilles et des organes floraux. L’huile essentielle produite s’accumule généralement dans des vacuoles extracytoplasmiques (Svoboda et al., 2000).



**Figure 2** : Glande sécrétrice chargée d’huile essentielle d’une fleur de lavande (Svoboda et al., 2000).

### 3.2. Les poils sécréteurs

Ce sont des structures très variables, uni- ou pluricellulaires qui résultent de la différenciation des cellules épidermiques. Ces poils sont ancrés par une cellule dite basale, surmontée d'une ou plusieurs cellules sécrétrices. L'huile essentielle produite s'accumule ainsi entre la membrane et la cuticule. On les retrouve souvent chez les Lamiaceae ou les Solanaceae (Howard, 2017).

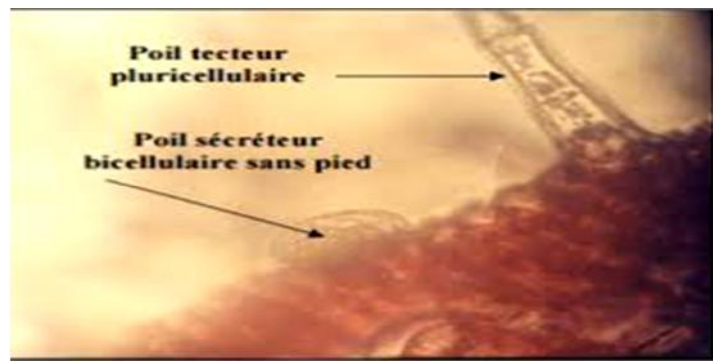


Figure 3 : poil sécréteur d'une feuille de thym (Howard, 2017).

### 3.3. Les poches sécrétrices

Ce sont des cavités du parenchyme, de forme arrondie, entourées par des cellules sécrétrices qui y déversent leurs produits de sécrétion (Svoboda et al., 2000).

Elles sont issues d'une seule cellule qui se cloisonne de deux façons possibles, pour cela on distingue des poches schizogènes et des poches schizolysigènes. Dans le cas des poches schizogènes, les cellules se disjoignent et forment en leur centre un méat où l'essence s'accumule, par exemple l'eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.). La formation des poches schizolysigènes se fait selon le même principe mais s'accompagne de la lyse des cellules en contact direct avec la lumière. On les retrouve dans le péricarpe des agrumes (Rutaceae) (Svoboda et al., 2000).

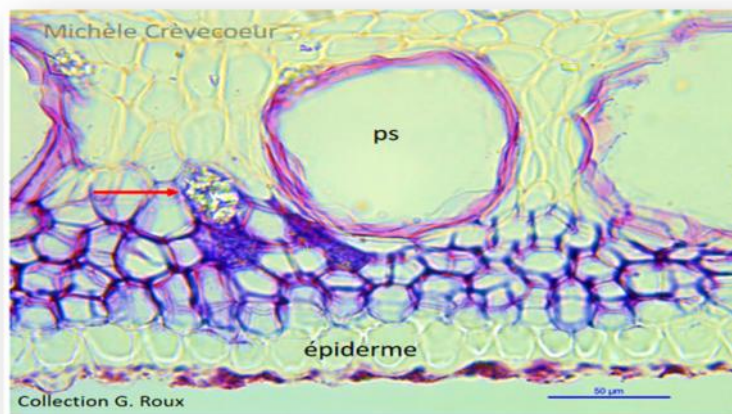


Figure 4 : Détail d'une poche sécrétrice et d'un cristal d'oxalate de calcium (Svoboda et al., 2000).

### **3.4. Les canaux sécréteurs**

Leur origine est proche de celle des poches schizogènes, mais ils viennent d'une file de cellules et non d'une unique cellule. En s'écartant, ces cellules forment un canal qui recueille les sécrétions. On trouve ces canaux dans le fruit de l'anis (*Pimpinella anisum L.*) (Caissard et al., 2004).

## **4. Caractérisation et Propriétés physicochimique des huiles essentielles**

Les essences et les huiles essentielles ont des propriétés physiques communes, qui peuvent cependant varier en fonction de leur composition chimique (Franchomme al., 2004).

### **4.1. La température**

À température ambiante, les huiles essentielles sont liquides à l'exception de certaines, par exemple : l'huile essentielle est visqueuse chez la myrrhe (*Commiphora myrrha*) (*T. Nees Engl.*), pâteuse pour le bois de gaïac (*Bulnesia sarmienti* Lorentz ex. Griseb.), solide pour le cèdre de Virginie (*Juniperus virginiana L.*) ou parfois la rose (*Rosa x damascena Mill.*) ou encore un mélange solide-liquide lorsqu'elle est extraite de la badiane (*Illicium verum Hook. F.*) (Fernandez et al., 2012).

### **4.2. La volatilité**

Les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les rend entraînaibles à la vapeur et particulièrement odorantes. Ce caractère les différencie aussi des huiles végétales grasses ou fixes. Si ces dernières laissent des taches indélébiles, la trace laissée par une huile essentielle tendra à disparaître plus ou moins rapidement. La volatilité étant très liée à la composition chimique, les monoterpènes sont par exemple beaucoup plus volatiles que les sesquiterpènes (Kaloustian et al., 2012).

### **4.3. La solubilité**

Les essences sont lipophiles et donc très peu solubles dans l'eau en général. Certains composants le sont cependant, comme par exemple la verbénone du romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) ou le lavandulol que l'on retrouve dans l'huile essentielle de lavande vraie (*Lavandula angustifolia Mill.*) (Franchomme al., 2004).

Certains composants sont même très hydrosolubles et vont favoriser l'apparition d'émulsion dans le produit de distillation lors de l'extraction. C'est, entre autre, le cas de l'huile essentielle d'écorce de cannelle de Ceylan (*Cinnamomum verum J.Presl*). Leur solubilité est totale dans les huiles grasses qui représentent leurs meilleurs solvants, elle est très grande dans les alcools à titres élevés et dans les solvants organiques (Franchomme al., 2004).

#### **4.4. La couleur**

La couleur des huiles essentielles est très variable. Cela comprend l'ultra-violet (UV) du zeste de mandarine (*Citrus reticulata Blanco*), le bleu (lié à la présence de chamazulène) des sommités de tanaïsie annuelle (*Tanacetum annuum L.*), le vert émeraude (azulène) de l'inule odorante ou de l'immortelle d'Italie (*Helichrysum italicum (Roth) G.Don*), le vert franc du nard de l'Himalaya (*Nardostachys jatamansi (D.Don) DC.*) ou encore le vert pâle du zeste de bergamote (*Citrus bergamia Risso & Poitet*). On retrouve également le rouge de certaines sarriettes (*Satureja sp.*) ou le jaune pâle de la sauge sclarée (*Salvia sclarea L.*) (Franchomme al., 2004).

La plupart des huiles essentielles ont une couleur jaune presque imperceptible. Elles foncent avec le temps (oxydation). Dans certains cas extrêmes, les huiles essentielles vieilles et oxydées présentent un risque toxique important (Kaloustian et al., 2012).

#### **4.5. La densité**

La densité ou densité relative d'une huile essentielle est le rapport de sa masse volumique à la masse volumique de l'eau distillée, à 20°C. Cette grandeur sans dimension est mesurée selon la norme NF T 75-111 à l'aide d'un pycnomètre. La densité des huiles essentielles est très souvent inférieure à 1 (densité de l'eau) et varie en fonction de leur composition chimique. La valeur de 0,92 peut être considérée comme une moyenne. Elle en est parfois très proche comme celle du zeste de mandarinier (*Citrus reticulata Blanco* : 0,9929), de santal blanc (*Santalum album L.*), ou d'écorce de cannellier (*Cinnamomum verum J.Presl.* : 1,0027) (Franchomme al., 2004).

Quelques huiles essentielles ont même une densité très supérieure à l'eau, par exemple celle de gaulthérie couchée (*Gaultheria procumbens L.* : 1,1807) ou d'oignon (*Allium cepa L.* : 1,54 à 1,58) (Fernandez et al., 2012).

#### **4.6. L'indice de réfraction**

L'indice de réfraction reflète le changement de direction subi par un rayon lumineux passant d'un milieu optique à un autre (par exemple de l'air à l'huile essentielle), à 20°C (Kaloustian et al., 2012). Il s'agit d'une grandeur sans unité, qui se mesure avec un réfractomètre d'après la norme NF T 75-112 (Franchomme al., 2004).

Dans le cas des huiles essentielles, l'indice de réfraction est généralement élevé. On peut donner comme exemple l'huile essentielle d'écorce de cannellier (*Cinnamomum verum J.Presl.*) dont l'indice de réfraction est compris entre 1,573 et 1,591 (Fernandez et al., 2012).

#### 4.7. Le pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire, caractéristique des molécules chirales, exprime la capacité qu'elles ont à dévier la lumière polarisée. Il s'agit de l'angle, exprimé en milliradian ou degrés d'angle, selon lequel tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse lorsqu'elle traverse une solution contenant des molécules chirales. Les huiles essentielles sont actives sur la lumière polarisée de manière très variable en fonction de la nature et de la concentration des différentes molécules chirales qu'elles contiennent. On mesure ainsi des valeurs de  $+105^\circ$  chez l'oranger (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) et de  $-17,75^\circ$  chez la menthe poivrée (*Mentha x piperita* L.) (Faucon, 2012).

#### 5. Composition chimique des huiles essentielles

Le nombre de différentes molécules constituant une huile essentielle est variable. La plupart sont polymoléculaires (Ex:jusqu'à 1000 molécules différentes dans l'huile de rose) (Belaiche, 1979). Ces différents constituants sont présents à des quantités très variable, alors on trouve à côté des composés majoritaires, d'autres composés qui sont minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces (Pibiri, 2006).

Les huiles essentielles des plantes sont souvent composées d'essences et d'une résine dissoute dans l'essence (Louarn, 1994).

Ces composés appartiennent à deux familles chimiques :

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

La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents qui sont majoritairement oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène pour quelques groupes azotés ou soufrés. (Selon Mailhebiau, 1994), (Franchome et al., 1990), cette structure varie en fonction de plusieurs critères :

- Du nombre d'atomes de carbone qui la constitue :
  - les monoterpènes.
  - les sesquiterpènes.
  - rarement les diterpènes.
- Du caractère saturé ou insaturé des liaisons.
- De leur agencement : linéaire ou cyclique.
- De la configuration spatiale : forme de chaise, de bateau, de trièdre...

- De la nature des groupes fonctionnels à savoir :
  - Terpène :  $R_1-HC-CH-R_2$
  - Alcools terpéniques :  $R-OH$
  - Cétones :  $R_1-CO-R_2$
  - Phénols :  $C_6H_5-OH$
  - Aldéhyde :  $R-CHO$
  - Esters :  $R_1-COO-R_2$
  - Ethers :  $R_1-O-R_2$

## 6. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles est un procédé complexe et délicat. Elles sont obtenues à partir de feuilles, fleurs, fruits, graines, bourgeons, de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, ou de tiges .... (Shaaban et al., 2012).

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. (Fernandez, 2017) et choix de la meilleure méthode adapté à l'extraction de l'huile essentielle se fait par rapport à la nature de la plante, ses caractéristiques physico-chimiques et leur usag. (De Lima, 2012). Parmi les différentes techniques qui existent, on rapporte ci-dessous les plus utilisés :

### 6.1. Hydrodistillation de type Clevenger

L'hydrodistillation est l'une des méthodes les plus anciennes et les plus faciles (Meyer-Warnod, 1984). Dont montage d'hydrodistillation de type Clevenger est généralement utilisé pour extraire l'huile essentielle. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Cette technique consiste à immerger la matière végétale broyée ou intacte dans un ballon rempli d'eau distillée et porter l'ensemble à ébullition (Rassem et al., 2016).

Ce mélange solide-liquide est ensuite chauffé et à la pression atmosphérique sous l'action de la chaleur, va libérer des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales, ce mélange ainsi obtenu est non miscible, qui peut être évaporé puis condensé dans un réfrigérant (Alouache et al., 2017) .l'huile essentielle se sépare de l'eau florale par simple différence de densité, donc l'huile essentielle étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysate (Bruneton, 2009).

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures (entre trois et six heures) selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter (Dick et Starmans, 1996).

Les avantages de l'hydrodistillation : Cette méthode est la plus utilisée, et la plus simple pour l'obtention des meilleurs rendements, sans altération des huiles essentielles fragiles, elle reste sans doute la plus rentable, elle est simple et ne nécessite pas un appareillage très peu coûteux (Penchev, 2010).

Ce procédé présente quelques limites : cette technique n'est pas adaptée à la distillation des fleurs, qui sont fragiles et ne supporte pas l'hydrodistillation. Elle peut endommager certains végétaux et altère certaines molécules aromatiques. (Boukhatem et al., 2019).

➤ L'appareil à hydrodistillation (Clevenger) est montré dans la figure (05).

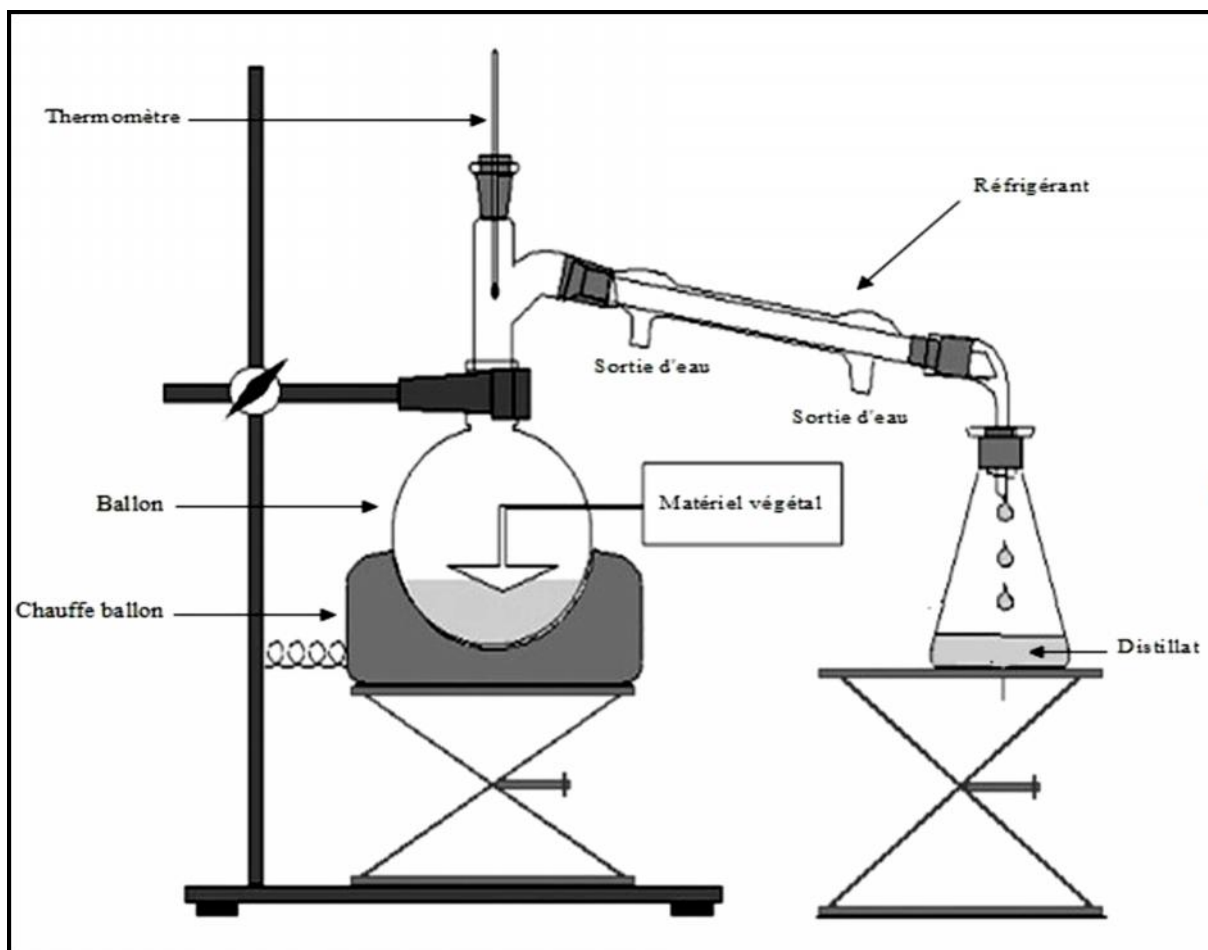


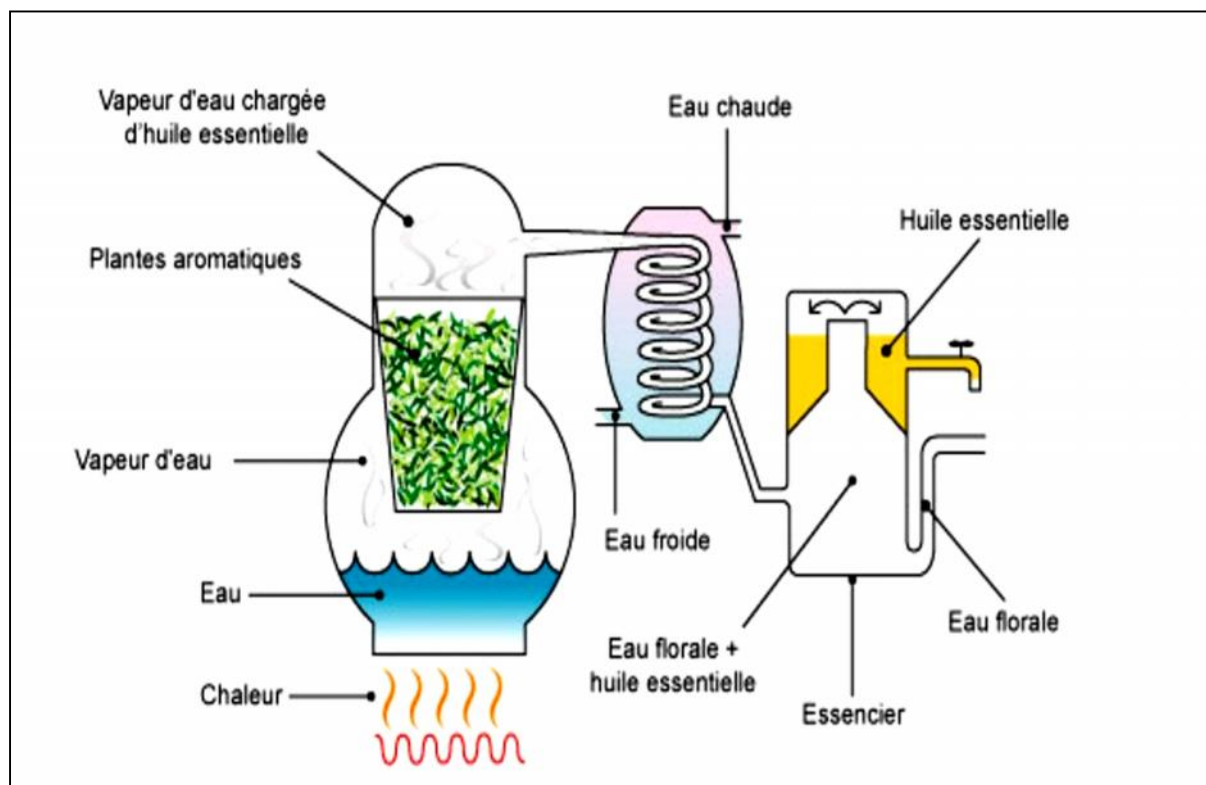
Figure 5 : Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger (Bruneton, 2009).

## 6.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Donc elle minimise les phénomènes de dégradation et d'hydrolyse pouvant nuire à la qualité de l'huile essentielle (Boukhatem et al., 2019).

Ce procédé consiste à récupérer l'huile essentielle des plantes en faisant passer à travers ces dernières un courant de vapeur d'eau. Durant le passage la vapeur libère des molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant puis condensées et récupérées par décantation (Chikhoun, 2007).

Les méthodes d'hydrodistillation et d'entraînement à la vapeur d'eau restent les deux méthodes dominantes en production commerciale des huiles essentielles (Carson et Hammer, 2011).



**Figure 6 :** Montage d'entraînement à la vapeur d'eau (Boukhatem et al., 2019).

### 6.3. L'expression à froid

L'expression à froid est destinée à l'extraction des essences volatiles contenues dans les fruits mais spécialement les agrumes, elle a une très grande importance dans l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cette technique d'extraction mécanique signifie que l'huile est pressée à basse pression et à basse température, elle est principe de cette technique est basé sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois (Rassem et al., 2016).

La méthode d'expression à froid est l'une des meilleures méthodes pour l'extraction des huiles essentielles, car elle garantit que l'huile résultante soit pure à 100% et conserve toutes les propriétés de la plante (Elhaib, 2011).

#### 6.4. Extraction par micro-ondes

Le procédé d'extraction par micro-ondes consiste à extraire l'huile essentielle par un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide (Chibani, 2013).

L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation (ramenée à quelques minutes), Economie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et incrémente le rendement d'extrait (Chemat et al., 2013).

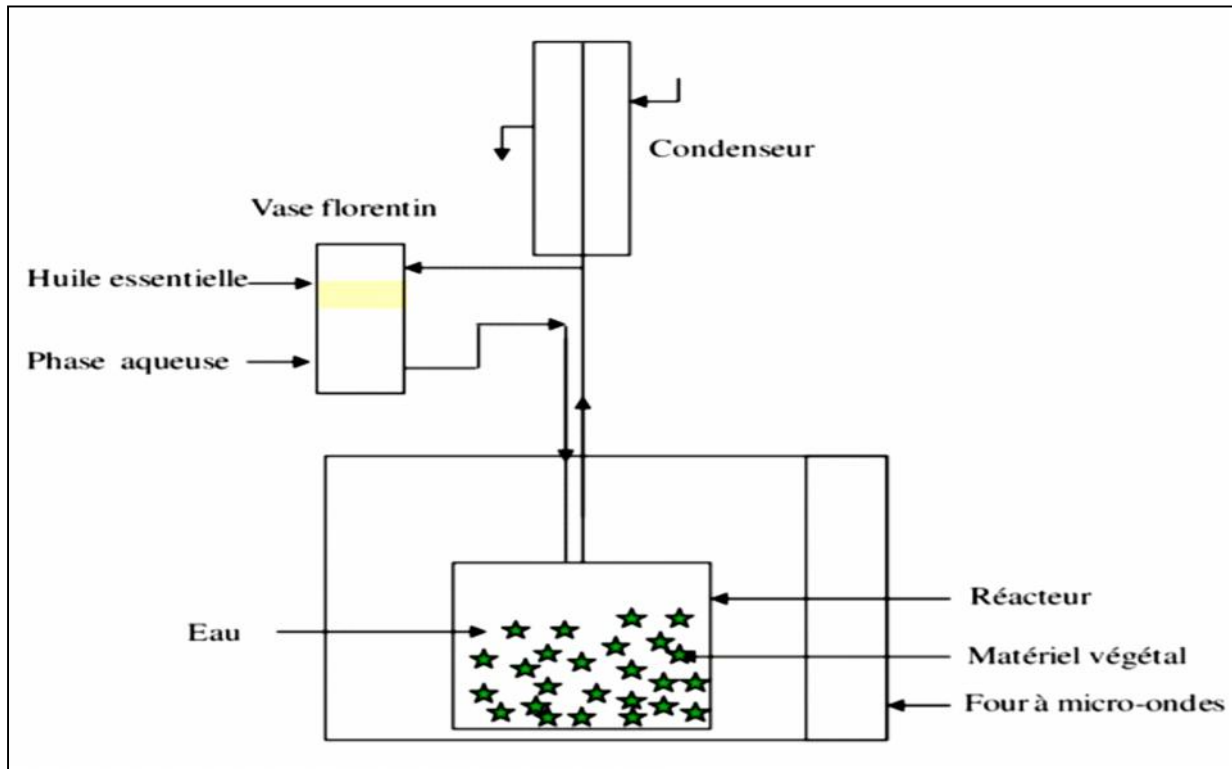


Figure 7 : Extraction par micro-ondes. (Boukhatem et al., 2019).

#### 6.5. Extractions au CO<sub>2</sub> supercritique

Les fluides supercritiques sont des substances qui se trouvent dans des conditions de température et de pression supérieures à sa température et sa pression critique (Muther, 2015).

Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Le produit à traiter est placé dans un extracteur traversé par le flux de CO<sub>2</sub> supercritique (plus de 74 bars et de 31 C°) (Fernandez, 2017). Le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (Muther, 2015).

Cette technique est plus complexe que les autres, et elle reste toujours à cout élevé (Burt, 2004).

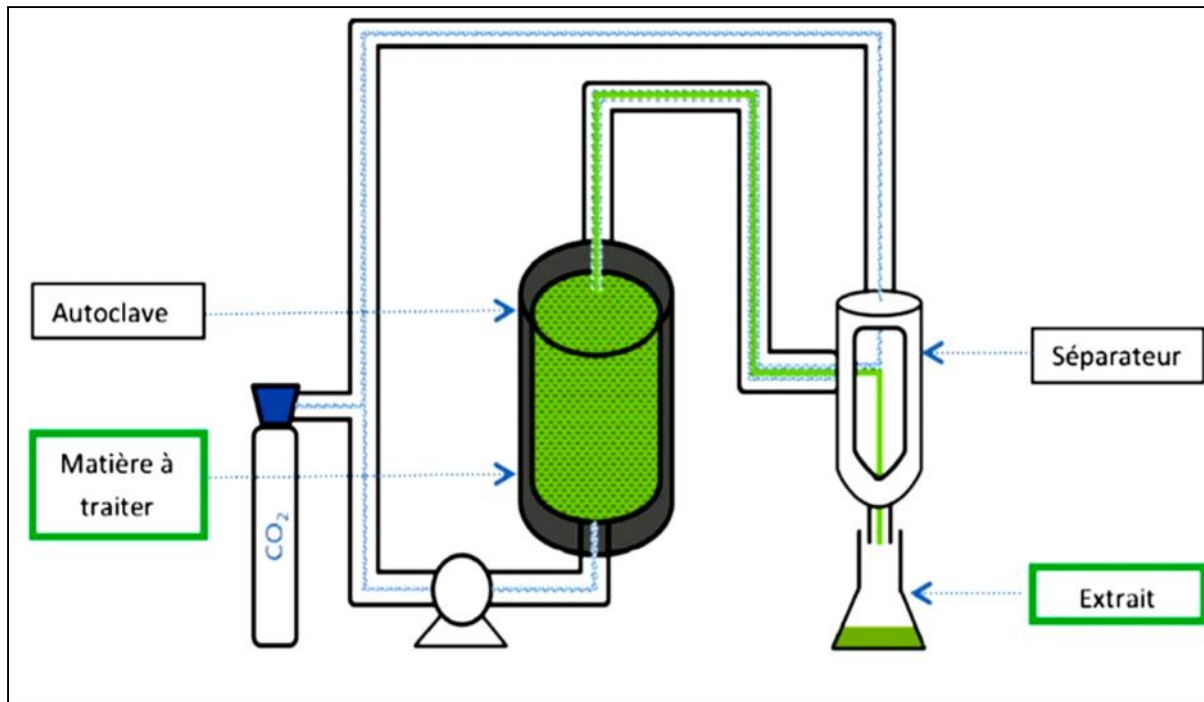


Figure 8 : Extraction au CO2 supercritique. (Boukhatem et al., 2019).

## 7. Le rôle des huiles essentielles chez les plantes

Les huiles essentielles sont des sécrétions naturelles élaborées par le végétal et contenues dans les cellules ou parties de la plante (Reynaud, 2011).

Les HE a une fonction dans la plante mais elle n'est pas bien définit (Asbahani et al., 2015) Mais ce qui est probable, c'est que le rôle des HE au niveau du matériel végétal est lié à leur situation (Reynaud, 2011).

En effet, les huiles essentielles contribuent à l'équilibre des écosystèmes. Leurs composants où l'odeur d'une fleur, attirent les abeilles et les insectes vers la plante responsables de la pollinisation (Reynaud, 2011).

Les HE possèdent des propriétés antifongiques et antibactériennes, elles ont aussi des propriétés attractives ou répulsives vis-à-vis des prédateurs (herbivores, insectes...) (Guignard, 1996) et surtout pour combattre les agressions extérieures, et protéger la plante contre les agents infectieux la flore microbienne infectieuse ou les parasites (Goetz et al., 2017).

La présence des HE au niveau des racines, des écorces, du bois, inhibent la multiplication des bactéries et les parasites du sol. Certains HE interviennent dans le métabolisme de la plante, ils peuvent être employés comme source énergétique (Guignard, 1996).

Ces HE jouent un rôle écologique dans les interactions : végétal-végétal, végétal-animal, elles peuvent transférer des messages biologiques sélectifs pour constituer des supports de communication (Bruneton, 2009).

## **8. Domaines d'utilisation des huiles essentielles**

Le nombre d'huiles essentielles connues est environ **3000** et autour de **300** celles ayant un intérêt commerciale (Bakkali et al., 2011). Elles présentent de multiples propriétés qui leur permettent de trouver des applications dans des domaines très variés, elles sont utilisées dans les domaines suivants :

### **8.1. En industries alimentaire**

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût (cafés, thés, tabacs, vins, yaourts, plats cuisinés,...), colorer et aromatiser les aliments (Aprotosoiaie et al., 2010). Elles sont également utilisées comme conservateur alimentaire (Conner, 1993). Grâce à leurs propriétés antimicrobiennes qui permettent d'augmenter la durée de conservation du produit (Bouguerra, 2012).

Il faut distinguer l'activité de l'huile essentielle et celle de la plante infusée. Il existe souvent un seuil, au-delà duquel, elles peuvent devenir toxiques. (Reynaud, 2011).

L'huile essentielle la plus utilisée dans le monde est celle de l'orange (Grysole, 2005).

### **8.2. En pharmacologie (Domaines thérapeutiques)**

Les huiles essentielles sont utilisées en pharmacie car elles présentent des propriétés pharmacologiques sur nombreuses cibles de l'organisme, parmi ces propriétés on cite : Cicatrisantes (Chibani, 2013).

Régulatrices du système nerveux, Insecticide, Anti-inflammatoire... (Muther, 2015)

Elles sont utilisées aussi dans certains médicaments.

Les HEs ont été employées dans le domaine pharmaceutique pour le traitement des infections des yeux et des oreilles, les gingivites, les hémorroïdes et pour arrêter la transpiration ainsi dans la désinfection de la pulpe dentaire, et dans le traitement et la prévention des caries (Chibani, 2013).

### **8.3. En parfumerie et cosmétique**

On retrouve les huiles essentielles dans de nombreux produits cosmétiques comme : savons, shampoings, gel-douches, crèmes,... afin de donner une odeur agréable au produit de Rose, de Jasmin, de violettes, de verveine... Exemple (*Mentha x piperita* L.), c'est l'HE de menthe poivrée qui est utilisée comme agent de saveur dans les dentifrices (Garneau et al, 2005).

L'utilisation des huiles essentielles dans les crèmes et les gels permet de préserver ses cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydant (Martini, 2011). Elles prennent soin de la peau et de ses désordres (acné, rides...), la silhouette, les cheveux (pellicules, cheveux cassants...). (Ouis, 2015).

**9. Toxicité des huiles essentielles**

Toute substance est potentiellement toxique à dose élevée ou répétée Comme pour un médicament (Degryse et al., 2008).

Les huiles essentielles aussi peuvent se provoquer un danger pour la santé, (Couic-Marinier et Lobstein, 2013). lorsque elles est mal utilisé cette toxicité serait liée à la dose administrée (Degryse et al., 2008).

Par exemple l'huile essentielle utilisée à l'état pur sur la peau peut révéler une irritation cutanée, et aussi elles peuvent déclencher des réactions allergiques chez des personnes sensibilisées (Degryse et al., 2008).

On trouve pour chaque huile essentielle un équilibre entre le bénéfice et le risque (Fekih, 2015).

## *Chapitre 2*

Monographie de l'espèce

*Thymus hirtus* willd.

## 1. Classification

Le *Thymus* appartient à la famille des Lamiacées. C'est l'une des familles botaniques les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antioxydant et antibactérien. Il est l'un des huit genres les plus importants en ce qui concerne le nombre d'espèces chez la famille Labiatae, bien que le nombre d'espèce de ce genre change selon le point de vue taxonomique ; si nous adoptons un caractère synthétique, il comporte plus de 200 espèces (Quezel et santa, 1963).

La classification botanique, selon le botaniste (Quézel, 1963) est la suivante :

**Tableau 1:** La classification botanique de *Thymus hirtus* willd.

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta
Sous-embranchement	Magnoliophytina
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<b><i>Thymus hirtus</i> willd.</b>

## 2. La famille des Lamiacées

C'est une famille de plantes aromatiques médicinales communément appelée Labiatae (Mamadaliyeva et al, 2017), Lamiacées, Labiacées ou labiées du latin labia : lèvre signifiant que les fleurs ont une forme caractéristique à deux lèvres (Naghbi et al., 2005), également connue sous le nom de famille de menthe (Mamadaliyeva et al, 2017).

La famille des Lamiacées est l'une des plus grandes familles du règne végétal, répartie sur l'ensemble de la surface de la planète. Elle comprend 12 sous-familles, 16 tribus, 9 sous-tribus, environ 295 genres et 7 775 espèces (Carlos et al., 2014)

De nombreux membres de cette famille sont économiquement avantageux et fréquemment utilisés à plusieurs fins médicinales, ornementales, commerciales et culinaires (Rehan et al., 2014)

La famille des Lamiacées est l'une des principales sources de plantes culinaires, végétales et médicinales dans le monde entier. Les genres *Mentha*, *Thymus*, *Salvia*, *Origanum*, *Coleus* et *Ocimum* sont utilisés comme aliments, légumes et dans l'industrie. Par ailleurs, plusieurs

Les espèces de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle et moderne (Naghibi et al, 2005).

La famille des lamiacées est très importante dans la flore algérienne, mais certains genres sont de détermination délicate en raison de la variabilité extrême des espèces (Quezel et santa, 1963).



**Figure 9 :** Répartition mondiale des lamiacées (Kadereit JW., 2004).

Les lamiaceae sont des plantes herbacées ou arbustives (Agostini et al., 2009). Les tiges sont quadrangulaire à leur base et très ramifiées. Les feuilles sont pétiolées et opposées (Dupont et al, 2012). Le fruit est un tétrakène logé au fond d'un calice persistant, chaque demi-carpelle donnant naissance à un akène élémentaire. (Dupont et al., 2012).



**Figure 10:** Photos de la famille des Lamiaceae. (Dupont et al., 2012).

### 3. Le genre *Thymus*

#### 3.1. Historique « Origine du nom »

Le nom *thymus* ou bien *thym* provient du mot grec " *thymos*" qui veut dire odeur. Que l'on brûle) et "parfum", grâce à l'odeur agréable que la plante dégage naturellement ou lorsqu'on la fait brûler (Richard ,1985)

Le nom *thym* proviendrait aussi bien du latin que du grec

- *Thymus* : "parfumer" (latin)
- *Thumus* : "courage" (grec) (Richard ,1985)

Le genre *Thymus* appartenant à la famille des Lamiacées et originaire d'Europe et d'Asie du Sud a plusieurs espèces largement réparties dans la zone méditerranéenne ; c'est le originaire de la famille de la menthe et comprend environ 100 espèces (Nouasri et al., 2015).

Le *thymus* a toujours accompagné la vie quotidienne de l'homme à des fins médicales, cosmétiques et culinaires. Il était parmi les première plantes médicinales dans la région méditerranéenn. (Chikhoune, 2007).

De nombreuses espèces de *thymus* sont utilisées dans diverses régions mondiales dans le traitement des affections bronchiques, pulmonaires, digestives, et les infections urinaires et possèdent des propriétés spasmolytiques, antitussives, et propriétés expectorantes. Plus de 11 espèces de ce genre poussent en Algérie (Laouer et al., 2006), parmi lesquels *Thymus hirtus* Willd. (El hamriya) et *Thymus lanceolatus* Desf. (Thym de lamanteau) sont les plus courantes (Quezel et Santa, 1963)

#### 2.3.2. Variabilité et origine

Le genre *Thymus* est à détermination toujours délicate en raison de l'extrême variabilité des espèces et des hybridations interspécifiques. (Quezel et Santa, 1963).

Environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen. En Europe, il existe plus de 40 espèces différentes. C'est pour cela que l'on peut considérer la région méditerranéenne comme le centre de ce genre. (Quezel et Santa, 1963).

### 3.4. Répartition géographique

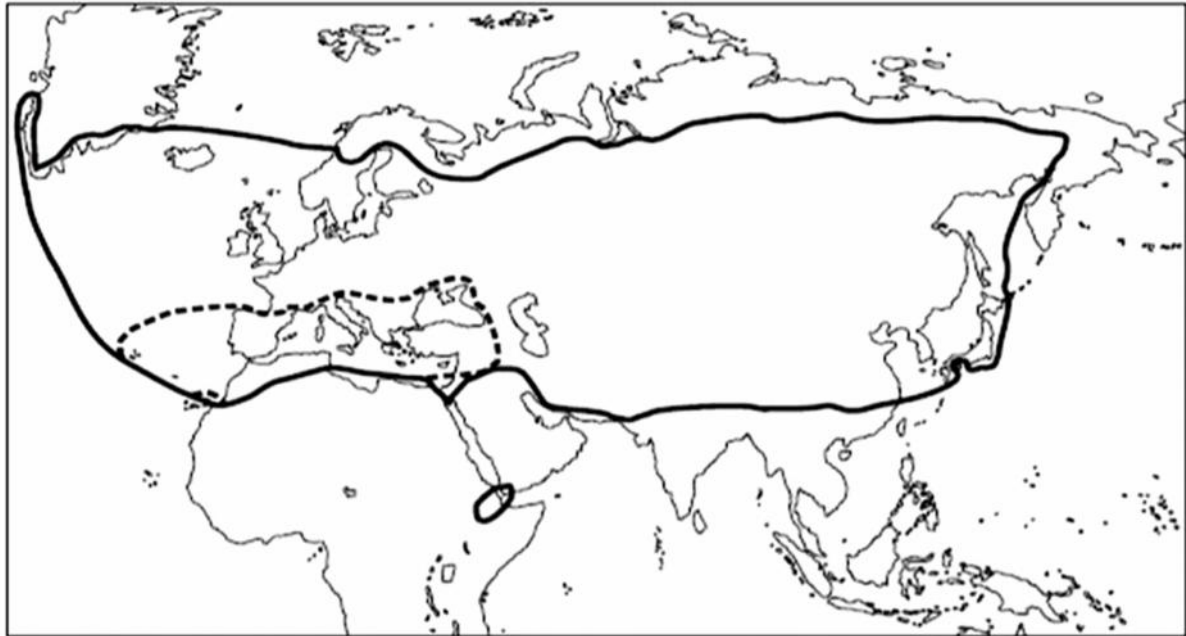
#### 3.4.1. Dans le monde

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des lamiaceaeé "labiées" (Naghibi et al., 2005).

Il existe près de 350 espèces de *thym* réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la Méditerranée (Benayache, 2000).

C'est une plante très répandue dans le nord-ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye). Elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud-ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte (Chikhounne, 2007).

On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya. (Aissani, 2015).



**Figure 11** : la distribution géographique de thym dans le monde (Le cercle noir représente la zone de distribution du genre *Thymus* dans le monde) (Abdelli, 2017).

### 3.4.2. En Algérie

Le *Thymus* comprend plusieurs espèces (300 espèces) botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'au zones arides. Parmi lesquelles une variabilité important localisées en Algérie (Chikhounne, 2007).

Le tableau 2 montre la localisation des principales espèces de thym en Algérie :

**Tableau 2** : les principales espèces de *Thymus* en Algérie (Quezel et Santa, 1963).

Espèces	Découverte par	Localisation	En arabe
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral	Djertil Hamrya
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et Link Rare	Dans la région de Tlemcen	zaitra
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans : Le sous-secteur de l'atlas tellien La grande et la petite	Tizaatarte

		Kabylie De Skikda à la frontière tunisienne Tell constantinoi	
<i>Thymus lanceolatus</i>	Desfontaine	Rare dans : le secteur de l'atlas tellien (Terni de Médéa Benchicao)	Zaâteur
<i>Thymus algeriensis</i>	Boiss. et Reuter	CC : dans toutes les régions montagneuses.	Djertil, Zaitra
<i>Thymus ciliatus</i> subs p. <i>coloratus</i>	(Boiss. et Reut.) Batt	C: dans le Tell	Djertil, zaitra
<i>Thymus ciliatus</i> subs p. <i>Euciliatus</i>	Maire	CC: dans toute l'Algérie.	Djertil, zaitra



Figure 12 : la répartition géographique de deux thymus dans l'Algérie (Quezel et Santa, 1963).

#### 4. L'espèce *Thymus hirtus* willd.

##### 4.1. Nom scientifique

Selon Quezel et Santa, (1963). Le nom scientifique de la plante est : *Thymus hirtus* willd.

#### 4.2. Noms vernaculaires

-Français : thymus

-Anglais : *Thymus hirtus* Willd.

-Arabe : زعيرة

-Appellations locales : جرتيل حمرية (Quezel et Santa, 1963).

#### 4.3. Description morphologique

Le thymus est une plante vivace rampante sous-ligneuse érigée ou prostrée, odorante, utilisée comme aromates. Il forme des touffes compactes très ramifiées qui s'élèvent à une vingtaine de centimètres au-dessus du sol, Il pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocaillieux et dans les garrigues. Les feuilles du thym sont plus au moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice quant à lui, est tubuleux à deux lèvres (Quezel et Santa, 1963).

La forme de touffes compactes de 10 à 30 cm de hauteur. Ses tiges sont ramifiées, sessiles, petites et étroite de forme lancéolée, de couleur bleu vert. Les fleurs (roses pâles ou blanches) réunies en épis au sommet des branches. Le fruit est formé de quatre akènes marron et presque ronds (Quezel et Santa, 1963).

Il se multiplie au printemps par semis, par bouturage ou par division des touffes. Il s'accommode de tous les terrains, mêmes humides. L'exposition au soleil est recommandée, car il a besoin de lumière et de chaleur. (Richard, 2006)

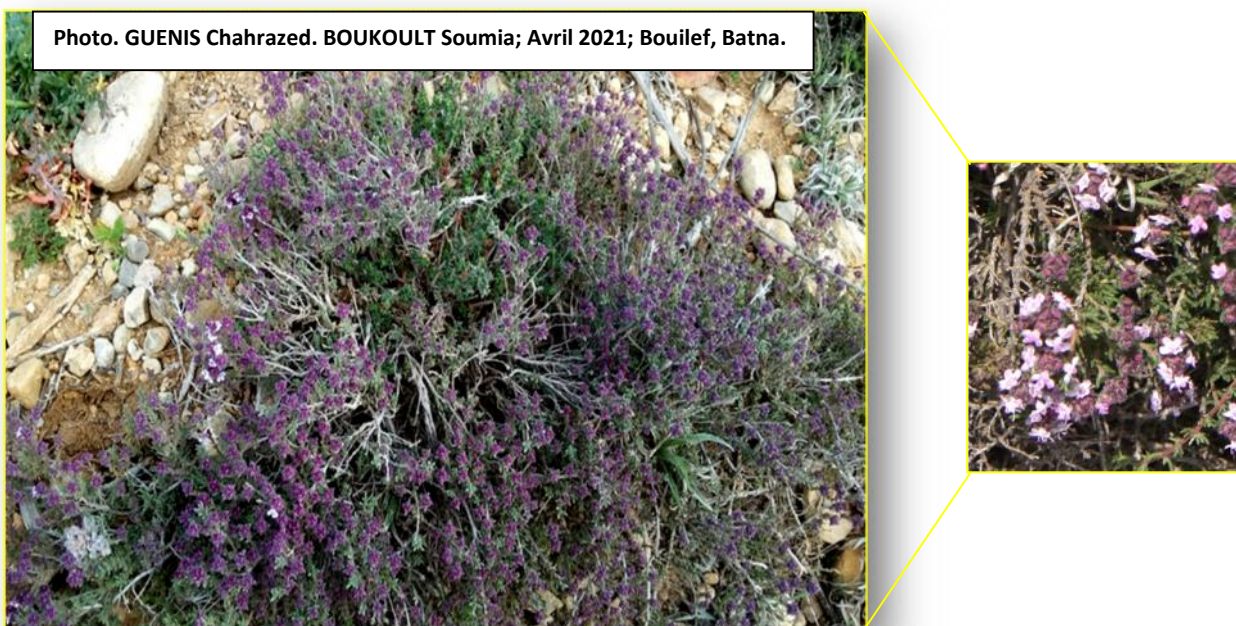


Figure 13 : La plante de *Thymus hirtus* Willd.

#### 4.4. Composition chimique de *Thymus hirtus* willd.

L'essence du genre thymus est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives (Mebarki, 2010).

Leur composition renferme des alcools, des phénols des aldéhydes, des cétones, des esters et quelques dérivés du phényle propane (Ložien , 1998).

La variabilité chimique des HE du *Thymus hirtus* willd dépend de plusieurs facteurs, qui généralement sont d'ordre climatique et environnemental, mais ils peuvent être aussi d'ordre génétique et saisonnier (stade végétatif) (Roux, 2007).

Les compositions les plus importants constituants l'espèce *Thymus hirtus* willd sont Le thymol et le carvacrol (Ložien , 1998).

C'est ainsi qu'une étude sur le *Thymus hirtus* willd. d'Afrique du Nord a démontré que le composé majoritaire était le thymol chez les espèces d'Algérie et du Maroc, et le carvacrol chez les espèces de Tunisie (Parthasarathy et al., 2008).

#### 4.5. Localisation en huile essentielle

A priori, toutes les plantes possèdent la faculté de produire des composés volatils mais seulement à l'état de traces le plus souvent. Parmi les espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques » (Spichiger, 2002).

La capacité à accumuler l'HE est cependant la propriété de certaines familles de plantes réparties au sein de l'ensemble du règne végétal (Roux, 2007), aussi bien représentées par la classe des gymnospermes Cupressaceae (bois de cèdre) et Pinacea (pin et sapin) que celle des angiospermes. Les familles les plus importantes sont les dicotylédones comme celles des Apiaceae (coriandre), Asteracea (camomille), Geraniaceae (géranium), Illiciaceae (anis), Lamiaceae (menthe)..... (Khandelwal, 2008).

Les HEs sont des sécrétions naturelles élaborées par le végétal et contenues dans les cellules ou parties de la plante (Serrato-Valenti et al., 1997).

Par rapport à *Thymus hirtus*, on trouve que la plante entière qui est utilisée dans l'extraction de HE (fleurs, feuilles, écorces, racines...) (Parthasarathy et al., 2008).

La botanique de la plante à partir de laquelle on distille l'HE est la partie aérienne. Mais très généralement, l'essence est extraite à partir de deux organes principaux à savoir : les fleurs et feuilles (Parthasarathy et al., 2008).

Seules les parties sécrétrices ou les plus concentrées de la plante *Thymus.hirtus* sont récoltées à la période de rendement optimum après la floraison (Maffei et al., 1989).

#### 4.6. Rendement de la plante TH

La quantité d'HE produite par la plante *Thymus hirtus* willd est minime, entraînant des rendements d'extraction extrêmement faibles, généralement inférieurs à 2%. (Sallé, 1991).

Le rendement le plus faible est observé pour les plantes *Thymus hirtus* willd et l'iris qui demande environ 4 kg de poudre pour obtenir 1 g d'absolue, ce qui explique le tarif exorbitant de ces huiles (Shiva et al., 2002).

#### 4.7. Caractérisation organoleptiques de l'HE

La caractérisation de l'huile essentielle consiste à vérifier ses caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur, saveur) (Mebarki, 2010).

Les caractères organoleptiques de l'HE sont déterminés par l'examen sensoriel de celle-ci. L'HE de *thymus hirtus* est un liquide mobile qui possède une couleur jaune pâle et une odeur très caractéristique (Mebarki, 2010).

#### 4.8. L'usage de *thymus hirtus* willd

Le Thymus a été utilisées dans plusieurs domaines comme tous les végétaux y compris la médecine, la nutrition, la teinture, les cosmétiques, en parfumerie, et pour l'aromatisation culinaire, ainsi que dans d'autres domaines d'industrie (Haddouche, 2011).

Il est utilisé pour faire les différents plats, Il contribue également dans le nettoyage et la cicatrisation des plaies, et aussi l'expulsion des gaz intestinaux, de mauvaise digestion (Haddouche, 2011).

En pharmacie, le thymus est employé en collutoires, dans les dentifrices, les savons, les onguents, les lotions, les pastilles pour la gorge et les remèdes antigrippes (Daoudi, 2016).

Le thym est une plante aromatique odorante, très utilisée en cosmétique. Son HE est couramment utilisé pour la confection de savons, des produits de beauté, des parfums, détergents et articles de toilette, produits d'hygiène, et d'autres produits (Bentayeb, 2014).

# *Chapitre 3*

*Activité antimicrobienne*

*des huiles essentielles*

### 1. Les huiles essentielles en tant qu'antimicrobiens

Les huiles essentielles et autres extraits sont obtenus à partir de matières végétales Meurs feuilles, acines, fruits, écorces, graines... (Rhayour, 2002).

Ils possèdent des propriétés antibactériennes antifongiques et antivirales, et sont actuellement considérés comme des alternatives potentielles aux antibiotiques pour traiter diverses maladies infectieuses (Rhayour, 2002).

Un agent antimicrobien est un agent qui tue les micro-organismes ou inhibe leur croissance. Celui qui les tue est appelé « microbicide » et celui qui inhibe seulement leur croissance est appelé « microbiostatique » (Drouet, 2018).

Il est connu depuis l'antiquité que les HE ont une activité antiseptique importante et sont utilisées dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques, agroalimentaire...etc. à la fin du XIX<sup>e</sup> et au début du XX<sup>e</sup> siècle, les travaux scientifiques étudiaient le pouvoir antiseptique des HE (Kaloustian et al., 2008)

Les HE sont utilisées en phytothérapie comme antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, telles que les bactéries endocanaliennes ou la microflore vaginale, et d'origine fongique telles que les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes. Elles possèdent une activité cytotoxique et sont utilisées en tant qu'agents antimicrobien à large spectre (Billerbeck, 2007)

Des études récentes ont montré que les HE ont un spectre d'action très large car elles inhibent la croissance bactérienne et fongique, et que leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique ainsi qu'à la nature de leurs composés volatils majeurs (Bouaoun et al., 2007).

L'activité antifongique des HE a été étudiée par Sacchetti et al. (2005). Ils ont utilisé cinq levures de pourritures d'aliments : *Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Yarrowia lypolitica*, *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerivisiae*. Les résultats ont montré que l'HE de *Thymus citriodorus* et *Cymbopogon citratus* étaient les plus efficaces pour inhiber les 5 levures testées. Plusieurs études ont décrit les effets antifongiques du thym sur les différentes levures et moisissures (Feng et al., 2007)

En effet, plusieurs auteurs ont étudié l'effet anticandidosique de l'HE de Thym in vitro (Ouraini D et al., 2007).

Sur le même horizon, Ouraini et al. (2007) ont montré que l'HE de thym (*thymus saturejoides* l.) possède des propriétés antifongiques in vitro sur les différentes étapes de la croissance des dermatophytes. L'effet antifongique de l'HE de *Thymus vulgaris* sous forme

gazeuse sur *Aspergillus*, *penicillium* spp, *Claadosporium* spp, *Trichoderma* spp, *Rhizopus* spp et *Mucor* spp, a été décrit par (Klaric et al., 2006).

Les recherches ont montré que la fonction antibactérienne s'exerce de deux manières selon les types de micro-organisme et de biomolécules (Klaric et al., 2006).

- Activité inhibitrice ou microbiostatique : blocage de la multiplication de cellules microbennes.
- Activités létale ou microbiocide : mort des cellules microbiennes (Klaric et al., 2006).

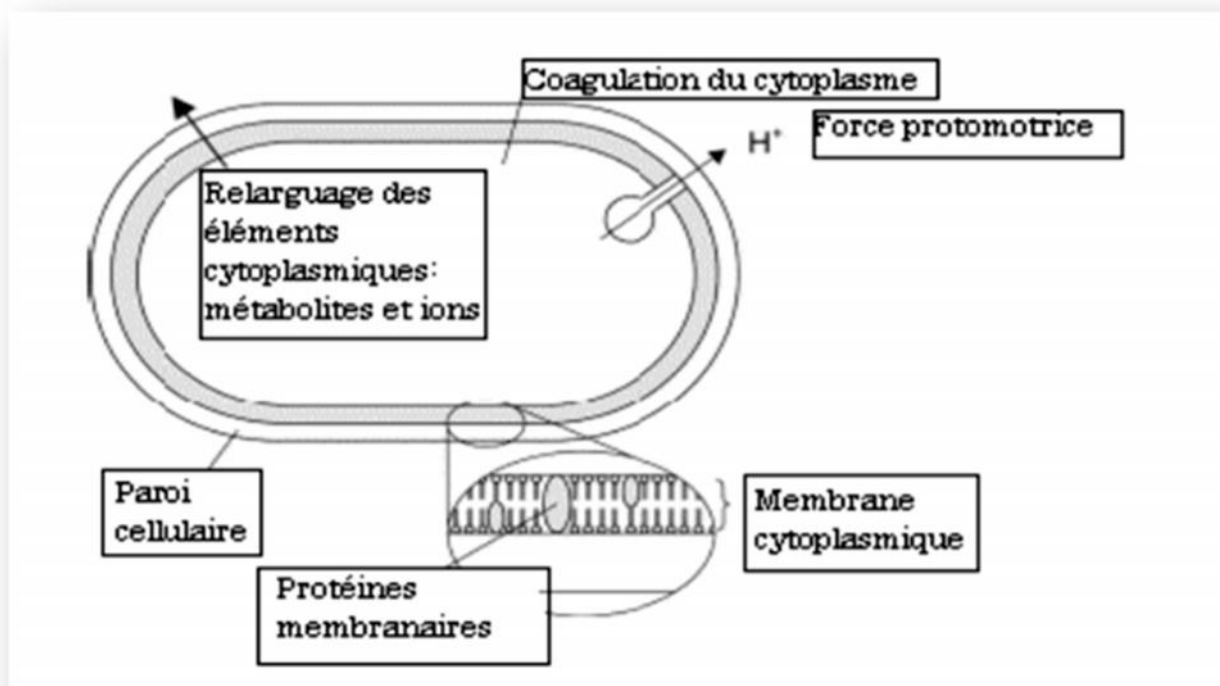
## **2. Mode d'action des HEs**

Les modes d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique. Cependant, la variabilité chimique des huiles essentielles laisse présager l'existence de molécules pouvant agir par de nouveaux mécanismes cellulaires (Guinoiseau, 2010).

La principale caractéristique des molécules présente dans les huiles essentielles est leurs hydrophobicité. Elle provoque leurs solubilisation dans les membranes ce qui permet une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema et al., 1994).

Parmi les mécanismes qui seraient mis en jeu, on cite :

- Précipitation des protéines et des acides nucléiques.
- Inhibition de la synthèse des macromolécules (ADN, ARN, protéine et peptidoglycanes).
- Inhibition de la perméabilité membranaire sélective et détérioration membranaire.
- Inhibition de la glycolyse et déplétion potassique.
- Modification de la morphologie de la cellule bactérienne.
- Absorption et formation d'un film autour de la cellule bactérienne avec inhibition des processus de respiration, d'absorption et d'excrétion (Cusson, 2007) (Figure 14).



**Figure 14 :** Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

### 3. Activité liée au microorganisme

Le type de micro-organismes ciblé est un paramètre très important qui détermine l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (Toure, 2015).

En général les différents micro-organismes n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis des huiles essentielles, car une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou encore n'avoir aucun effet. Ceci peut être lié au type de microorganisme (à Gram positif ou à Gram négatif), à son métabolisme et à sa résistance. (Cusson, 2007).

En effet, les bactéries Gram négatif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries Gram positif grâce à la structure de leur membrane externe. (Toure, 2015).

Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatif est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que ceux de Gram positif la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. (Toure, 2015).

la pluparts des bactéries (Gram+ et Gram-) sont pathogènes, elles sont connues pour leur forte antibiorésistance et leur pouvoir invasif et toxique chez l'homme. (Voir tableau 03).

Tableau 3 : Généralités sur quelques souches bactériennes (Abdelli, 2017).

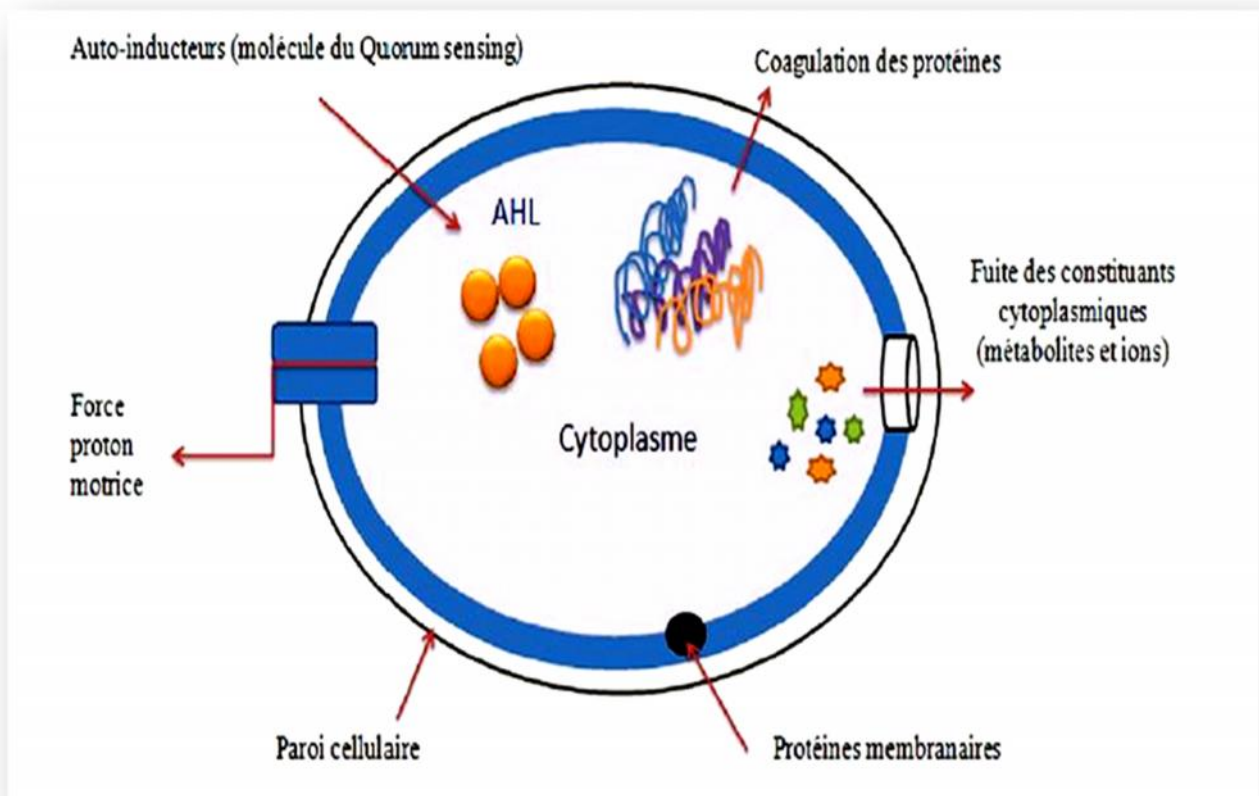
bactéries	Gram	Habitats	Pouvoir pathogène
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Gram +	- Les fosses nasales - La gorge - Le tube digestif -Infection hospitalière.	- Responsable des abcès, des plaies, des septicémies, de pneumonie
<i>Escherichia coli</i>	Gram –	-Le tube digestif -Infections urinaires	-Septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastroentérites.
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Gram –	- Les sols et en milieu humide (nuages, robinets, bouchons), - milieu <u>hospitalier</u>	- responsable d'infections nosocomiales
<i>Enterococcus sp</i>	Gram +	- la <u>flore commensale</u> - le tractus digestif et génito-urinaire (dont urètre)	- causant des septicémies - infections urinaires, ou abdominales d'origine intestinale. - la cause de plus de 10 % des <u>infections nosocomiales</u>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram –	-le tube digestif -l'appareil respiratoire des animaux (dont l'Homme) -bactéries commensales -les autres habitats comprennent les eaux usées, l'eau potable, les sols, les eaux de surface, les effluents industriels et la végétation.	-infections respiratoires (pneumonies, abcès pulmonaires, pleurésies), - infections intestinales - infections urinaires -elle a un effet cytotoxique sur les épithéliums des voies aériennes -infections nosocomiales.

#### 4. Propriétés antibactériennes des HEs

Les HEs agissent sur les bactéries non seulement localement, mais aussi, au niveau de différents sites cellulaires (Bajpai et al., 2013).

Elles peuvent affecter la morphologie des bactéries, ses mécanismes de régulation ainsi que certaines de ses structures spécifiques (Bouyahya et al., 2017).

Cette action antibactérienne dépend vraisemblablement de la composition chimique des HEs (Swamy et al., 2016). Les HEs opèrent principalement au niveau de la paroi cellulaire des bactéries mais, peuvent également affecter les protéines, les acides gras membranaires, influencent le Quorum-sensing (capacité des bactéries à détecter et réagir aux molécules de signalisation) et la production d'ATP (Bouyahya et al., 2017).



**Figure 15 :** schéma représentant les différents sites d'action des huiles essentielles au niveau d'une cellule bactérienne (Bouyahya et al., 2017)

## 5. Propriétés antifongiques des HEs

Les HEs agissent à différents niveaux :

- Sur la paroi ;
- Sur la membrane ;
- Sur la synthèse des acides nucléiques ;
- Sur la synthèse des stérols (Razzaghi et al., 2009).

Les huiles essentielles et leurs composants présentent également une activité contre les champignons, activité qui est de mieux en mieux décrite. Un large éventail de pathogènes fongiques humains, animaux et agricoles ont montrés une importante sensibilité aux huiles essentielles in vitro, ce qui accroît l'intérêt pour leur application thérapeutique ou industrielle.

L'HE est un produit à fort potentiel antifongique (Moghaddam et al., 2016).

En effet, une étude a démontré que les HEs diminuent le volume des cellules fongique, induit une fragilisation du biofilm et par conséquent son inhibition (Barbosa et al., 2019).

Les principales molécules responsables de cette toxicité fongique sont les terpénoïdes et flavonoïdes lipophiles, qui interagissent avec les composants membranaires et modifient leur arrangement (Barbosa et al., 2019).

Parmi les composants des huiles essentielles responsables de l'activité antifongique, c'est le carvacrol et le thymol qui ont prouvé une action sur des espèces fongiques responsables de l'altération des aliments telles qu'*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Razzaghi et al., 2009).

## 6. Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne des HEs

Pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes des HE, diverses méthodes sont utilisées. Le choix des techniques utilisées pour déterminer leur activité antimicrobienne a une grande influence sur les résultats (Rhayour, 2002).

Ces techniques sont appliquées en milieu solide ou en milieu liquide, et elles permettent soit de caractériser le pouvoir antimicrobien soit de le quantifier en termes de concentration minimale inhibitrice ou de concentration minimale bactéricide CMB (Rhayour, 2002).

### 6.1. Méthodes qualitatives

#### 6.1.1. La méthode de l'aromatogramme

C'est une méthode qui permet de démontrer in vitro le pouvoir anti-infectieux des HE. Il est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques (Belaiche, 1979)

Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri.

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester (Raynaud, 2006).

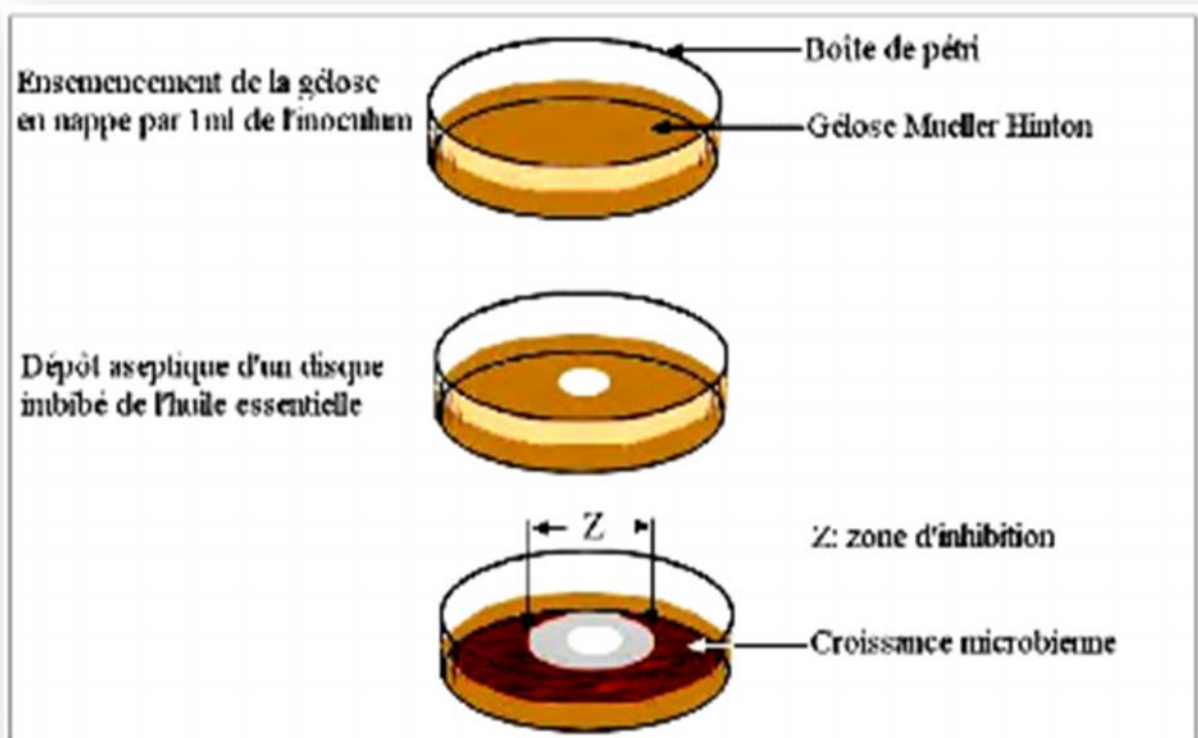
Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier (Salle, 2004).

L'HE diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration (Salle, 2004).

Les bactéries croissent sur toute la surface de gélose sauf là où elle rencontre une concentration d'HE suffisante pour inhiber leur croissance (Valnet, 2003).

On observe ainsi autour des disques, une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition (Salle, 2004).

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique, plus il est petit, plus la bactérie est résistante (Valnet, 2003).



**Figure 16** : illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri (Raynaud, 2006).

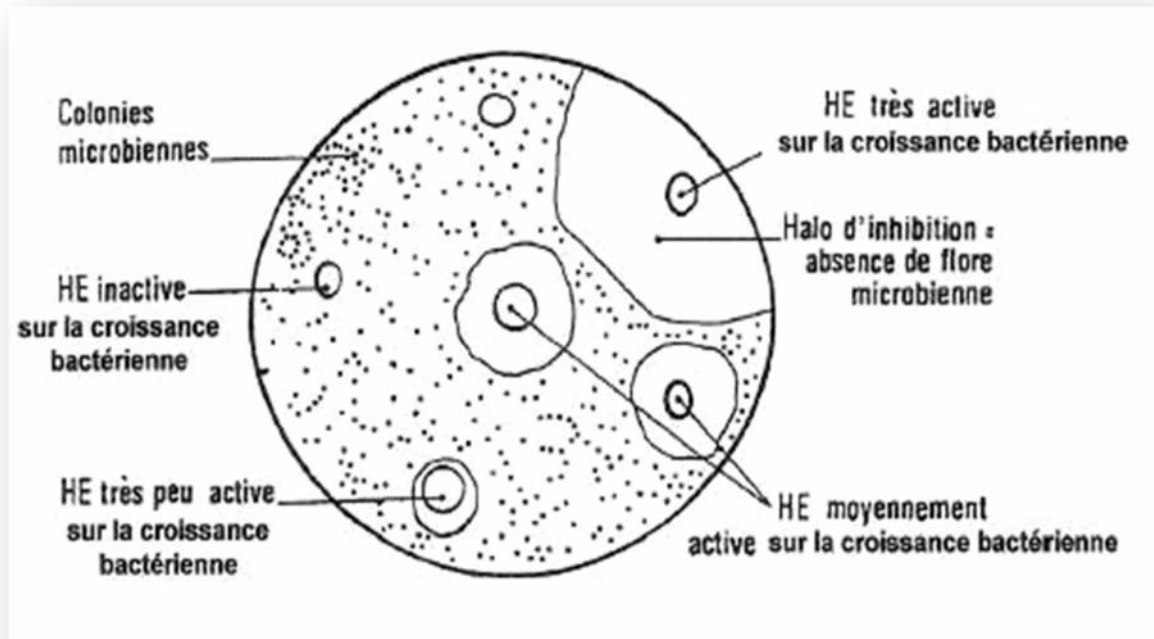


Figure 17 : Exemple d'aromatogramme (Raynaud, 2006).

### 6.1.2. La méthode de micro-atmosphère

Le protocole des micro-atmosphères est techniquement proche de celui des aromatoگرامmes. La différence se trouve principalement dans la position du disque imprégné. (Suhr et al., 2003).

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Petri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé (Suhr et al., 2003).

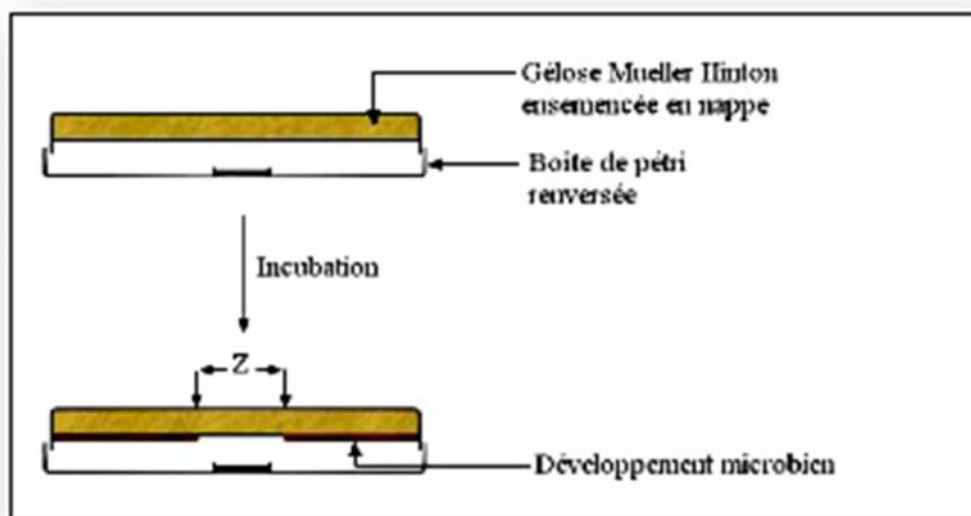


Figure 18 : illustration de la méthode des micro-atmosphères (Raynaud, 2006)

## **6.2. Méthodes quantitatives**

### **6.2.1. La méthode des CMI**

C'est une technique de détermination des concentrations minimale inhibitrice par contacte directe en milieu gélosé ou liquide. C'est à dire la plus faible concentration en huile capable d'inhiber 90% de la population microbienne sans affecter la qualité de l'aliment (Chebaibiet et al., 2016).

Elle consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié (Chibani, 2013).

### **6.2.2. La méthode des CMB**

Détermination de la concentration minimale bactéricide et fongicide (CMB et CMF) en milieu solide parfois appelée aussi létale (CML) (Davidson et al., 1989).

C'est une méthode qui a pour but de déterminer la concentration minimale en HE nécessaire à laquelle l'action bactéricide est totale, sur un inoculum donné après un temps bien déterminé (Mnayer, 2014).

*Partie*  
*pratique*

# *Chapitre 01*

## *Matériel et méthodes*

Ce présent travail représente un mémoire de fin de cycle pour l'obtenir de Master en Microbiologie appliquée. L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus hirtus* Willd., cette dernière est obtenue par hydrodistillation.

Notre étude a été effectuée dans une période d'un mois (du 21 Avril 2021 jusqu'au 23 Mai 2021) au niveau des laboratoires du Hall technologique, à l'université de Abbés Laghrour Khenchela.

## 1. Matériel végétal

### 1.1. Identification botanique de la plante

Plusieurs échantillons de la plante ont été prélevés dans la zone de collecte décrite ci-dessous, ensuite, l'identification a été faite au département d'agronomie, Université de Batna 1. Cela par Pr OUDJEHICH Bachir après observation macroscopique et microscopique et comparaison de l'aspect botanique et morphologique de plante aux critères d'identifications présentés par (Quezel et Santa, 1963).

### 1.2. Préparation du matériel végétal

#### 1.2.1. Collecte de la plante

Les parties aériennes de *Thymus hirtus* willd. ont été récoltées au stade de la floraison au mois d'avril-mai 2021 dans la région de Bouief à Batna à l'est de l'Algérie (Figure 19), cette zone et caractérisée par un climat semi-aride et un sol rocheux, dont ses coordonnées géographiques sont les suivantes: latitude 35°35'59.7"N longitude 6°12'53.4"E et altitude 991 mètres.

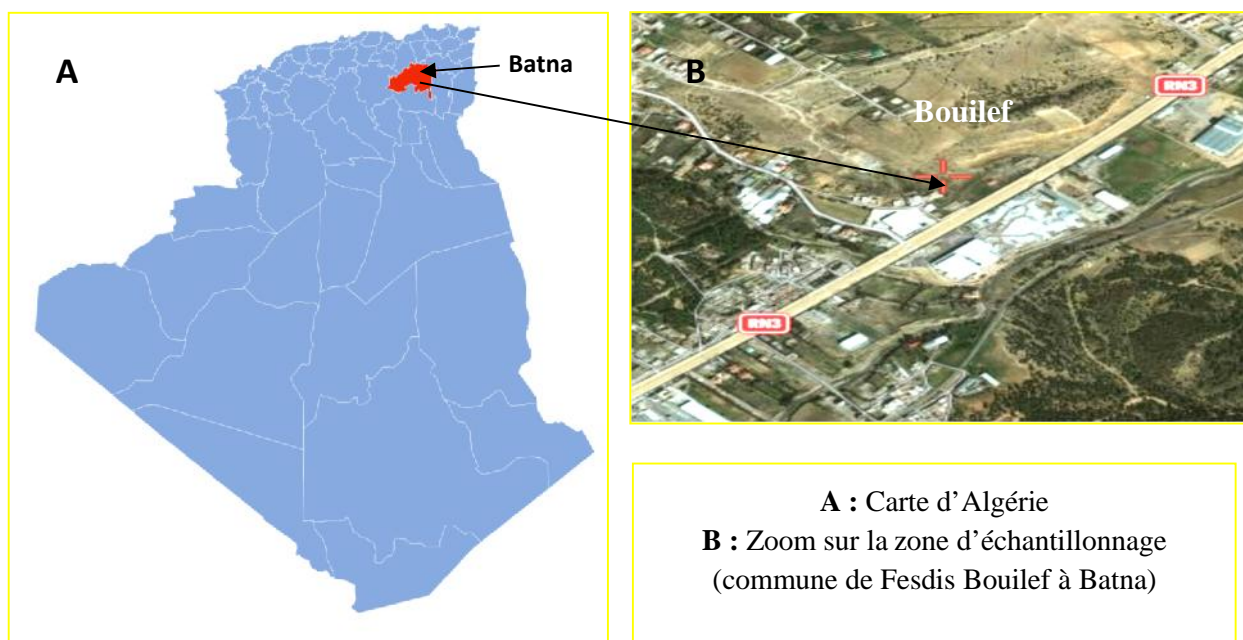


Figure 19 : Zone d'échantillonnage

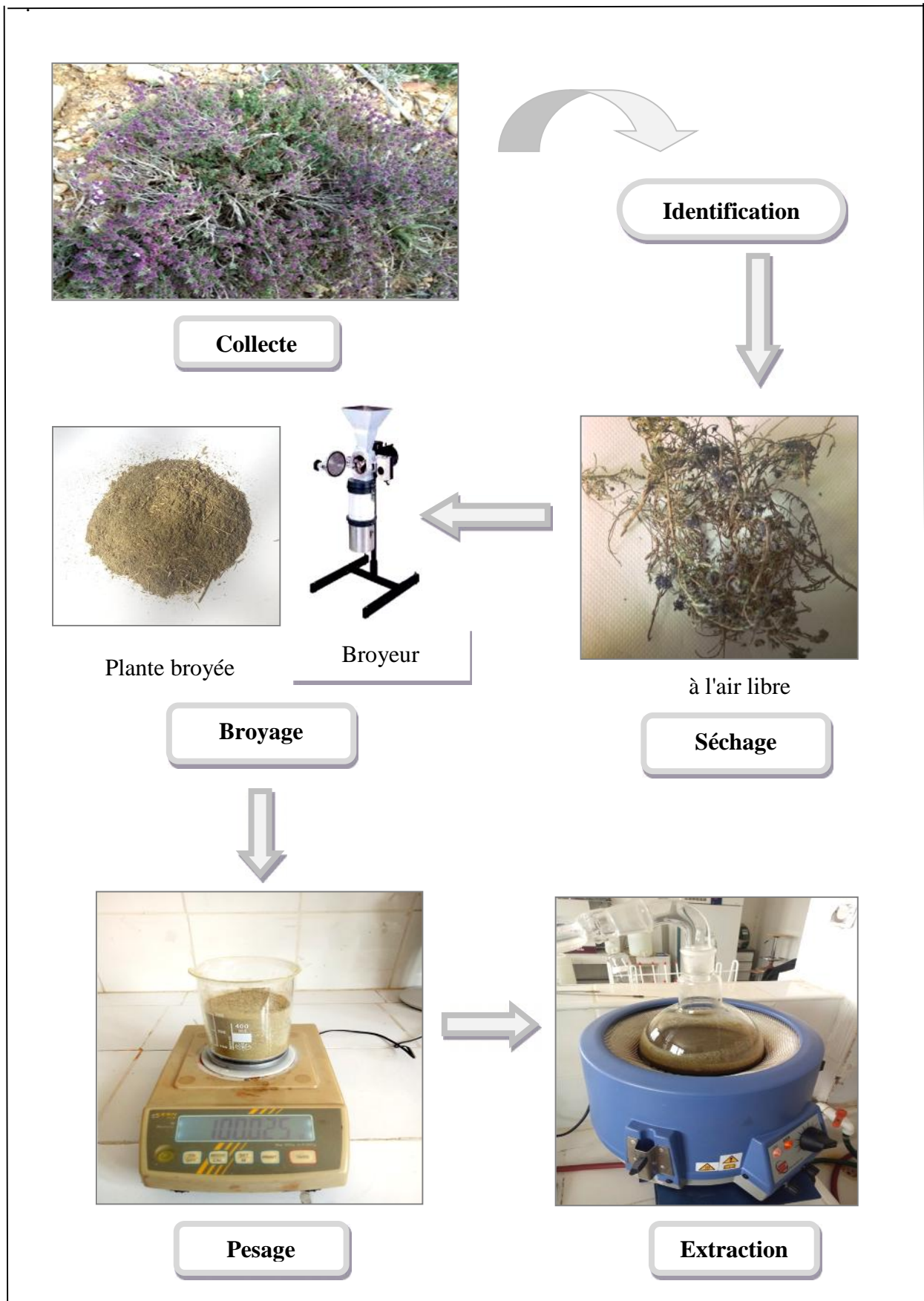


Figure 20 : Schéma de la Préparation du matériel végétal

### 1.2.2. Séchage

Après la récolte et l'identification, les parties aériennes de la plante ont été nettoyées des impuretés et séchées à l'air libre, à température ambiante et à l'ombre, puis conservées dans des sachets en plastique est aérés.

### 1.2.3. Broyage

Après le séchage de la plante, on a procédé à un simple broyage à l'aide d'un broyeur pour faciliter le processus d'extraction de l'huile, ensuite la plante broyée est conservée dans des sacs en papier afin d'éviter une éventuelle humidité capable de provoquer une altération microbienne, jusqu'à ce quelle servent à l'extraction de l'huile essentielle

## 2. Extraction de l'HE du *Thymus hirtus* Willd.

Dans notre travail, on a choisi de réaliser l'extraction de l'HE par hydrodistillation.

### 2.1. Procédé d'hydro-distillation

L'extraction a été réalisée par hydro-distillation dans un appareil de type Clevenger modifié (Figure 21), qui consiste à introduire 100g de la plante broyée (partie aérienne), dans un ballon, qui a été rempli ensuite de l'eau distillée (1000ml), ainsi placé dans un chauffe-ballon et porté à ébullition pendant 3h, la température du chauffage ne doit pas excéder 100°C.

Lors du chauffage, l'HE va être entraînée avec la vapeur d'eau, dans un tube qui est en permanence refroidi par un flux de circulation d'eau, ce qui favorise le refroidissement de du liquide obtenu (Hydrolat et huile essentielle), qui sera ensuite condensée dans l'ampoule à décanter. Cette opération a été conduite pendant plusieurs jours (une semaine), jusqu'à l'obtention de la quantité voulue de l'HE.

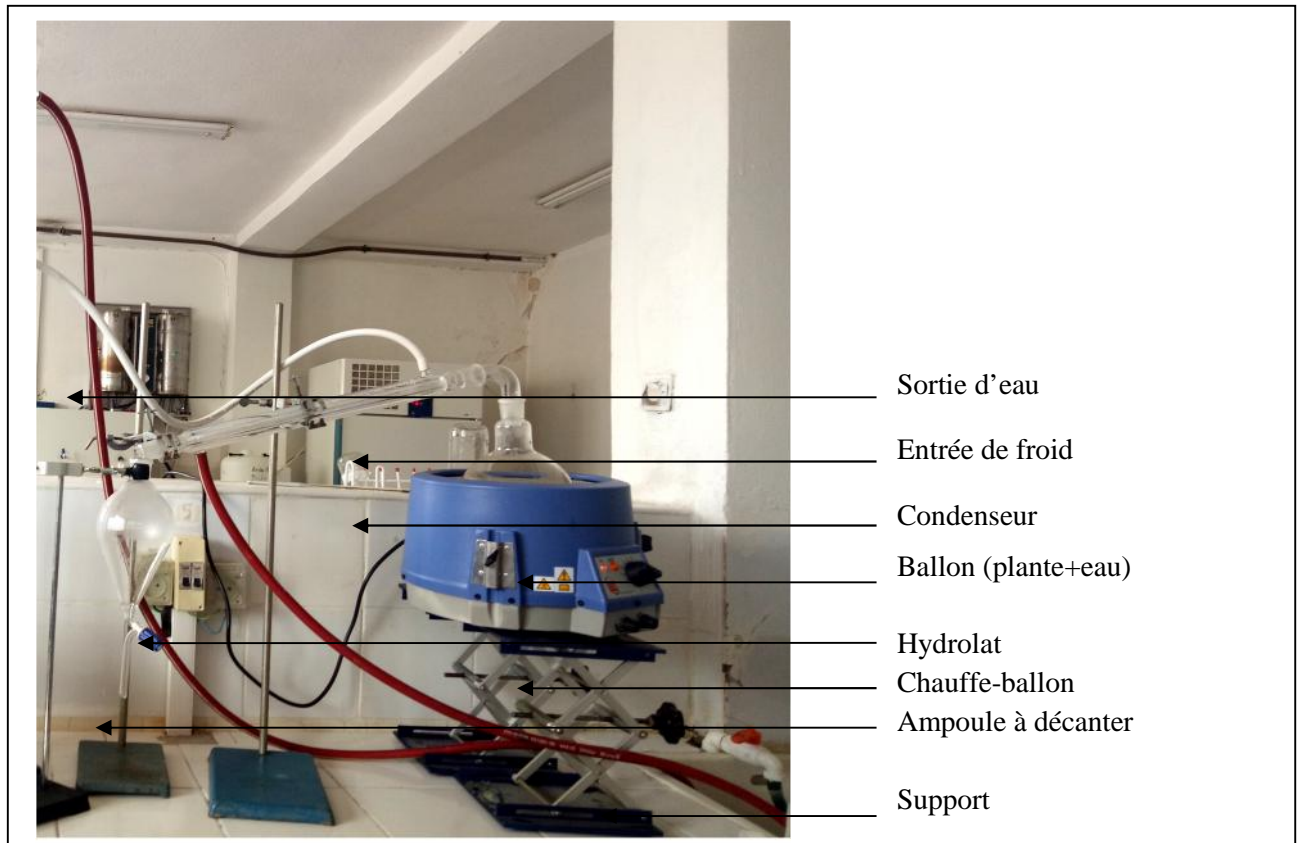


Figure 21 : Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger modifié.

### 2.1. Récupération et conservation de l'HE

L'HE condensée a été récupérée par décantation (Figure de l'ampoule à décanter contenant de l'HE) et desséchée avec du sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ), puis mise dans un flacon de verre opaque et conservée à 4°C jusqu'à l'utilisation. (Figure 22).

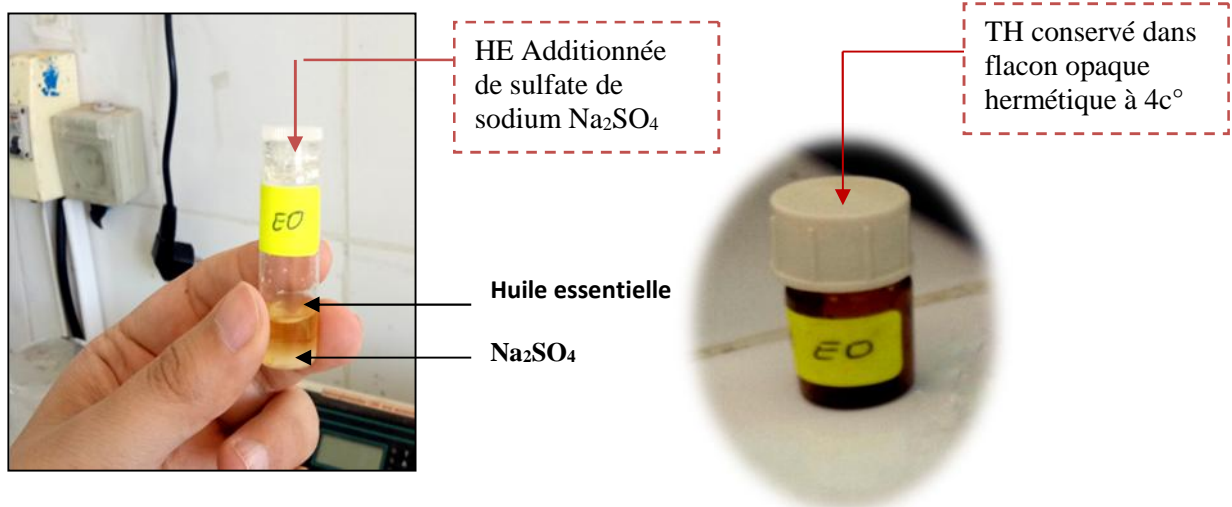


Figure 22 : Conservation de l'HE du TH extraite

## 2.2. Détermination du rendement

Le rendement en HE est généralement lié à la méthode utilisée, le type et la qualité de la plante, l'appareil et au procédé suivi dans des conditions opératoires bien précises, à savoir la durée d'extraction et l'état de la plante (Li et al., 2014).

La durée d'extraction est un facteur très important, car le rendement en HE s'accroît d'une façon proportionnelle à la durée d'extraction, ce qui par conséquent permet d'obtenir un bon rendement.

## 3. Activité antimicrobienne

Dans ce présent travail, nous avons étudié l'activité antibactérienne ainsi que l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Thymus hirtus* willd. sur un ensemble de bactéries et de moisissures.

### 3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de la sensibilité des souches bactériennes à l'HE consiste à vérifier leur réaction à une concentration définie de cette HE. Cette approche statique implique généralement l'application de deux méthodes; l'une qualitative (l'aromatogramme) et l'autre quantitative qui sert à déterminer la CMI et la CMB.

#### 3.1.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont des bactéries pathogènes *Escherichia coli* - *Klebsiella pneumoniae* - *Pseudomonas aeruginosa* - *Staphylococcus aureus* - *Enterococcus sp.* (Voir tableau 04), dont plusieurs sont résistantes aux antibiotiques, (voir tableau 05).

Ce sont des souches de bactéries (Gram+ et Gram-), elles sont pathogènes et certaines sont connues pour leur forte antibiorésistance et leur pouvoir infectieux chez l'homme à travers le monde.

L'activité antibactérienne a été étudiée contre **05** souches bactériennes, qui nous ont été fournies par un laboratoire d'analyse médicales privé, et certaines d'autres proviennent de la collection du laboratoire pédagogique de la faculté SNV. Les détails sont décrits dans le tableau 04, ci-dessous:

Tableau 4 : les souches bactériennes utilisées.

Bactéries	Code	Gram	Nature du prélèvement clinique
<i>Escherichia coli</i>	EC 1	–	Urine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA	–	pus
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KP 1	–	Urine
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA 1	+	Urine
<i>Enterococcus sp</i>	Entéro	+	Urine

### 3.1.2. Antibiogramme

Il existe plusieurs techniques pour réaliser un antibiogramme. Le plus souvent, les bactéries sont « ensemencées » à la surface d'une boîte de Pétri, sur un milieu gélifié, et des disques chargés d'une dose connue de différents antibiotiques sont déposés à la surface de la gélose. Si l'antibiotique est inefficace, les bactéries pourront tout de même croître et l'on pourra mesurer la taille de leur colonie. Au contraire, si l'antibiotique est efficace, on apercevra à la surface du disque des « zones d'inhibition », où la croissance bactérienne a été inhibée (Raynaud, 2006).

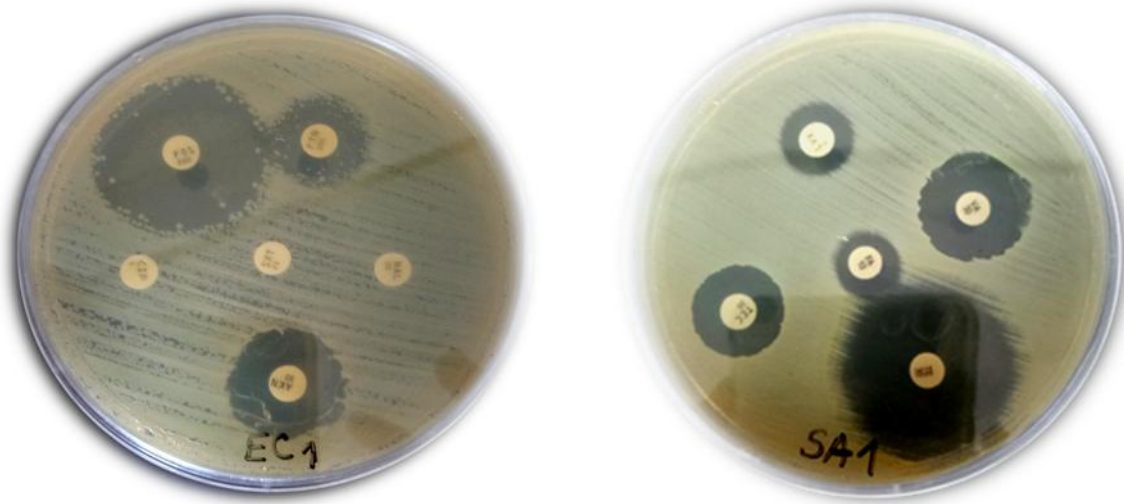
L'antibiogramme des bactéries qu'on a testées révèle qu'elles sont résistantes à plusieurs antibiotiques (20 ATB). (Tableau 05), et cela vu les diamètres des zones d'inhibition enregistrés (Figure 23).

Tableau 5 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) par antibiogramme des souches bactériennes testées

Les antibiotiques / Diamètres des zones d'inhibition																				
Les souches	AMC 30	FOX 30	AKN 30	NAL 30	FTN 300	CIP 5	SXT 25	FOS 200	ETP 10	CZN 30	AMP 10	GMN 10	ATM 30	IPN 10	VA 30	FA 10	TE 30	LVX 5	TEC 30	CTX 30
E-coli 1	/	/	20	0	18	0	0	30	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
KP 1	/	/	/	/	/	/	/	/	35	/	/	26	35	30	/	/	/	/	/	/
SA 1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	20	13	32	16	17	/

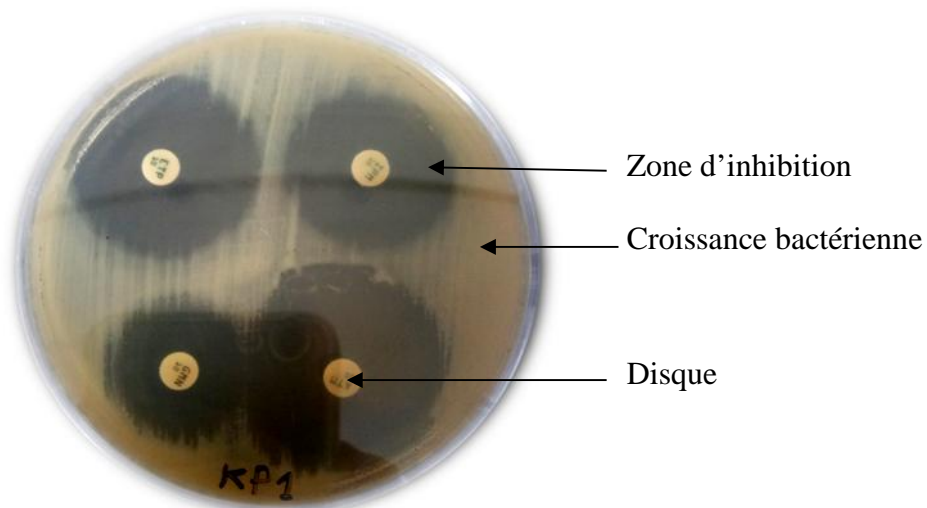
Amoxicilline (AMC) - Cefoxitine (FOX) - Kanamycine (AKN) - Acide nalidixique (NAL) - Furanes (FTN) - Ciprofloxacine (CIP) - Sulfaméthoxazole-triméthoprime (SXT) - Fosfomycine (FOS) - Ertapénem (ETP) - Cefazolin (CZN) - Ampicilline (AMP) - Gentamicine (GMN) - Aztréonam (ATM) - Imipénème (IPM) - Vancomycine (VA) - Acide fusidique (FA) - Tétracycline (TE) - Levofloxacine (LVX) - Teicoplanin (TEC) - Cefotaxime (CTX).

**NB:** *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus sp* n'ont pas un antibiogramme.



*Escherichia coli* 1

*Staphylococcus aureus* 1



*Klebsiella pneumoniae* 1

Figure 23 : Zones d'inhibition par antibiogramme des souches bactériennes

### 3.1.3. Repiquage des souches bactériennes

Avant d'entamer les expérimentations de l'évaluation de l'activité bactérienne, un repiquage des souches bactériennes a été effectué, alors le protocole consiste à faire des ré-isolement des colonies bactériennes de chaque souche dans un bouillon nutritif, puis repiquage en surface sur gélose nutritive, ensuite incubé dans une étuve à 37°C pendant 24h. (Figure 24).



**Figure 24** : Repiquage des souches bactériennes.

### 3.1.4. Méthode de diffusion sur disque (l'aromatogramme)

#### 3.1.4.1. Le choix de milieu de culture

Le milieu choisi pour les souches bactériennes est Muller-Hinton (MH), qui a été préparé et coulé aseptiquement dans les boîtes de Pétri à une épaisseur de 3-4 mm. (Figure 25)



**Figure 25** : préparation de milieu MH

### 3.1.4.2. Préparation de suspensions bactériennes

Les suspensions bactériennes ont été préparées par prélèvement de colonies bien isolées à partir d'une culture pure de 24h à l'aide d'une anse de platine, puis ces colonies ont été déchargées dans 10 ml d'eau physiologique stérile. Après agitation la suspension est devenue homogénéisée. (Figure 26).



**Figure 26** : Préparation de suspensions bactériennes

### 3.1.4.3. Ensemencement

L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne, ce dernier a été frotté sur toute la surface gélosée (MH), de haut en bas, en stries bien serrées. L'opération a été répétée deux fois en tournant la boîte à chaque fois de 60°, puis l'écouvillon a été passé sur la périphérie de la gélose pour finir l'ensemencement (Figure 27). Pour chaque souche bactérienne, deux ensemencements ont été réalisés.



**Figure 27** : Ensemencement des souches bactériennes sur milieu gélosé (MH).

#### 3.1.4.4. Préparation des disques

Les disques ont été préparés à partir du papier filtre du diamètre de 6 mm avec un contour régulier, qui ensuite ont été stérilisés à l'autoclave pendant 20min à 120°C.

Les disques ont été déposés à l'aide d'une pince stérilisée au bec Bunsen, au centre de la surface gélosée (MH).

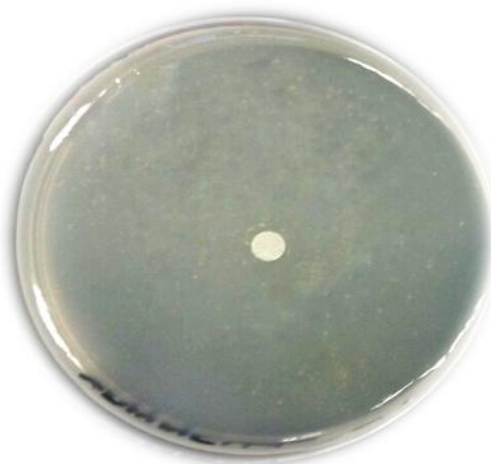


Figure 28 : Préparation des disques

Pour chaque boîte de petri, on a déposé un seul disque au centre, qu'on a imbibé de 6  $\mu$ L de l'HE de *Thymus hirtus* willd. (TH) à l'aide d'une micropipette. (Figure 28)

Les boîtes de petri ont été fermées et incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

La lecture a été réalisée par la mesure de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne.

#### 3.1.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice représente la plus faible concentration d'une substance capable d'inhiber dans un milieu (soit milieu liquide ou milieu solide), toute croissance visible à l'œil nu après 24 heures d'incubation à 37°C. Autrement dit, c'est la concentration minimale d'huile essentielle qui produit une réduction de plus de 90% de la croissance des colonies microbiennes, donc ne laisse survivre que 10% de la population (Bouguerra, 2012)

L'évaluation de la CMI se pratique en milieu solide ou en milieu liquide, la méthode que nous avons utilisée est celle des dilutions en milieu liquide en utilisant des plaques à 96 puits; alors l'HE a été diluée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 40% (v/v) et ajoutée au milieu en plus du milieu de culture (MH) dans chaque puits, ensuite 500  $\mu$ l de la suspension bactérienne (La procédure suivie pour la préparation des suspensions bactériennes est la même que celle décrite précédemment dans la méthode de l'aromatogramme) sont ajoutés. Les concentrations finales en HE obtenues sont présentées dans le tableau 06.

La microplaque a été incubée dans une étuve à 37° C pendant 24h. La lecture se fait en cherchant la croissance bactérienne en utilisant un révélateur TTC. La CMI est déduite à partir du premier qui ne présente pas de culture bactérienne. Un témoin a également été réalisé.

**Tableau 6 :** les micro-dilutions successives en milieu liquide pour la réalisation de la CMI.

Dilution	T	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>	D <sub>7</sub>
Volume de l'HE (µL)	50	50	50 (D <sub>1</sub> )	50 (D <sub>2</sub> )	50 (D <sub>3</sub> )	50 (D <sub>4</sub> )	50(D <sub>5</sub> )	50(D <sub>6</sub> )
Volume de DMSO (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50
Volume de MH (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100
Concentration finale en HE (Mg/ml)	0	80	40	20	10	5	2.5	1.25

Où T : Témoin

### 3.1.6. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB décrit l'effet bactéricide d'une substance, elle correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de détruire plus de 99.9% de la suspension bactérienne (François et al., 2016)

La détermination de la CMB a été réalisée en faisant un ensemencement sur milieu gélosé (MH), à partir de chaque puits n'ayant pas révélé une croissance bactérienne.

Après l'ensemencement, les boîtes de pétri ont été incubées dans une étuve à 37° C pendant 24h.

## 3.2. Evaluation de l'activité antifongique

### 3.2.1. Souches fongiques

L'activité antifongique des huiles essentielles a été testée sur trois moisissures appartenant à trois espèces différentes *Aspergillus fumigatus* - *Aspergillus terreus* - *Fusarium oxysporum*, un code a été attribué à chaque souche étudiée (Tableau 07).

Le choix des souches fongiques était basé sur leurs implications dans la contamination, l'altération des denrées alimentaires et des cultures céréalières et certaines sont mêmes phytopathogènes pour les cultures végétales. Ces échantillons proviennent de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, de l'université d'Oran 1.

**Tableau 7** : les souches fongiques utilisées.

Champignons	Codes
<i>Fusarium oxysporum</i>	FOX 1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AF 1
<i>Aspergillus terreus</i>	AT 1

### 3.2.2. Le choix de milieu de culture

Le milieu choisi pour les souches fongiques est Glucose Agar (Sabouraud), qui a été préparé et coulé aseptiquement dans (06) boîtes de Pétri à une épaisseur de 3-4 mm. (Figure 29)

Une fois le milieu refroidi, nous étiquetons le nom de la souche sur la boîte de pétri.

**Figure 29** : préparation de milieu Sabouraud (SAB)

### 3.2.3. Repiquage des souches fongiques

Il consiste à faire des ré-isolement des colonies fongiques de chaque souche sur Glucose Agar (Sabouraud), le repiquage des souches fongiques se déroule d'une manière spécifique:

On prend avec l'anse de platine un explant des anciennes boîtes des champignons, que nous avonsensemencé sur le milieu Glucose Agar (Sabouraud) (Figure30), ensuite incubé dans une étuve à 25°C pendant 24h puis 48h.



Figure 30 : Repiquage des souches fongiques

#### 3.2.4. Préparation de suspensions fongiques

Les suspensions fongiques ont été préparées par prélèvement d'un petit morceau des souches cultivées (milieu gélosé associé à la souche fongique) que nous avons transféré dans des tubes d'eau physiologique stérile de (10 ml) à l'aide d'une anse de platine, le (1/3) de la boucle de l'anse de platine dans les tubes ; après on réalise une agitation de la suspension pour l'homogénéiser. (Figure 31).



Figure 31 : Tubes contenant des solutions fongiques jeunes

### 3.2.5. Méthode de diffusion sur disque (L'aromatogramme)

Le pouvoir antifongique de l'HE de *Thumus hirtus* willd. a été étudié par la technique de diffusion sur disque, un volume de (1 ml) de la solution préalablement préparée (suspension fongique) a été prélevée à l'aide d'une micropipette et versé sur le milieu gélosé on étalant toute la surface par rotation de la boîte de pétri, ensuite l'excédent a été aspiré et le milieu est laissé pendant quelques minutes pour sécher. Ensuite, des disques de papier filtre (6 mm de diamètre) ont été déposés au centre de chaque boîte et imbibé d'HE à raison de 6  $\mu$ L/disque.

Après incubation de 4 jours à 25°C, la lecture a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque. Le test est réalisé en trois réplifications et la moyenne et l'écart type ont été calculés.

*Chapitre 02*

*Résultats  
et  
discussion*

## 1. Résultats et interprétation

### 1.1. Résultats de l'activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle « TH » a été réalisée in vitro sur des souches microbiennes de référence et cliniquement isolées, au total 5 souches bactériennes ont été étudiées (03 gram négatif et 02 gram positif) ainsi que 03 souches de moisissures.

#### 1.1.1. Résultats de l'activité antibactérienne

##### 1.1.1.1. L'aromatogramme

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire et inhibiteur de l'HE à partir de disque sur le milieu gélosé. L'évaluation de pouvoir antimicrobien a été mise en évidence en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de la prolifération microbienne pour l'HE vis-à-vis les souches testées (Conn, 2005).

Après incubation, la présence de zone d'inhibition est observée autour des disques actifs contre la souche testée. Le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, moyennant une règle graduée. L'absence de zones d'inhibition claires autour des disques d'agar, indique un résultat négatif qui montre que les souches bactériennes sont résistantes à l'HE. Plus cette zone est grande, plus l'activité antibactérienne est importante (Véron, 1990).

La présence des zones d'inhibition indique un résultat positif. Cette zone est observée autour des disques ce qui signifie que l'HE produit des molécules antibactériennes capables de stopper la croissance des bactéries testées. (Véron, 1990).

Une évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de TH par la méthode des aromagrammes a été réalisée en suivant la méthode réalisée par Bertella.A, (2019). Les résultats sont représentés dans le tableau 8.

**Tableau 8 :** Zones d'inhibition de l'HE de TH des souches bactériennes testées.

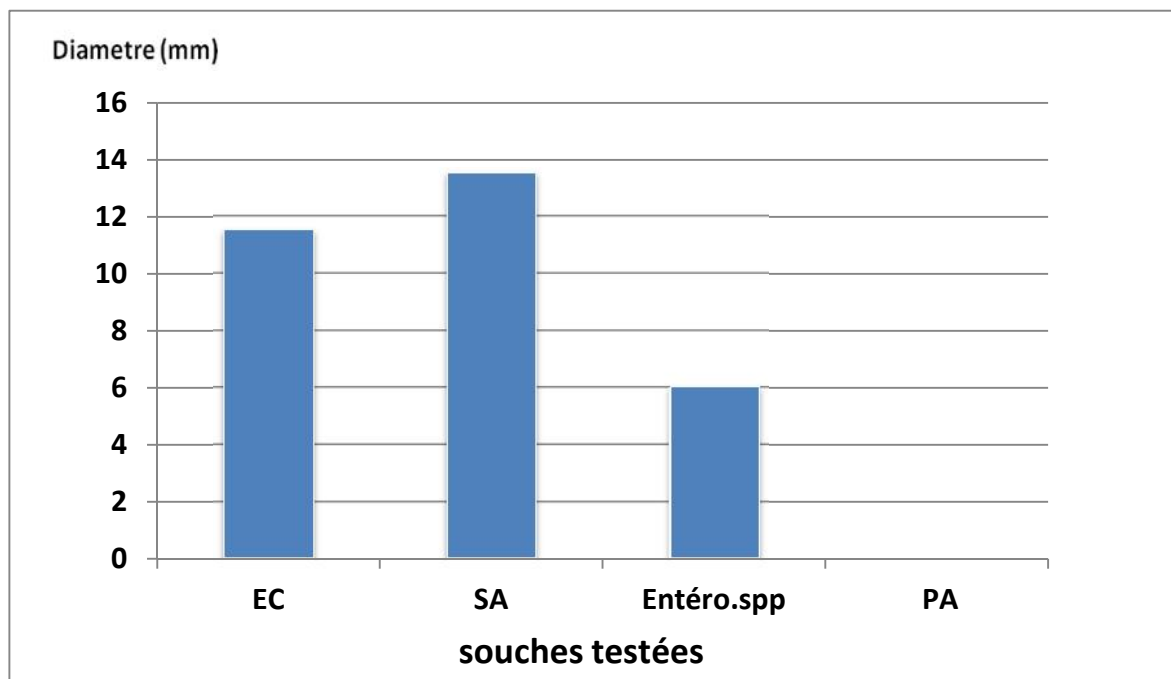
Bactérie	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
EC	11.5
SA	13.5
ENT sp	6
PA	0

Ces résultats montrent que l'HE du TH étudiée présente un pouvoir antibactérien moyen sur les bactéries *E.coli* et *S.aureus* et une faible action inhibitrice sur la bactérie *Entérobacter spp*, et absence d'action inhibitrice sur la bactérie *P.aeruginosa*. Autrement dit, la bactérie *Entérobacter spp* est plus résistante que les bactéries *E.coli* et *S.aureus* et *P.aeruginosa*.



**Figure 32** : Zone d'inhibition de la croissance bactérienne d'*E.coli* par l'HE de TH.

La figure suivante montre l'histogramme des zones d'inhibition des souches bactériennes testées. (Figure 33).



**Figure 33** : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne de chaque souche testée.

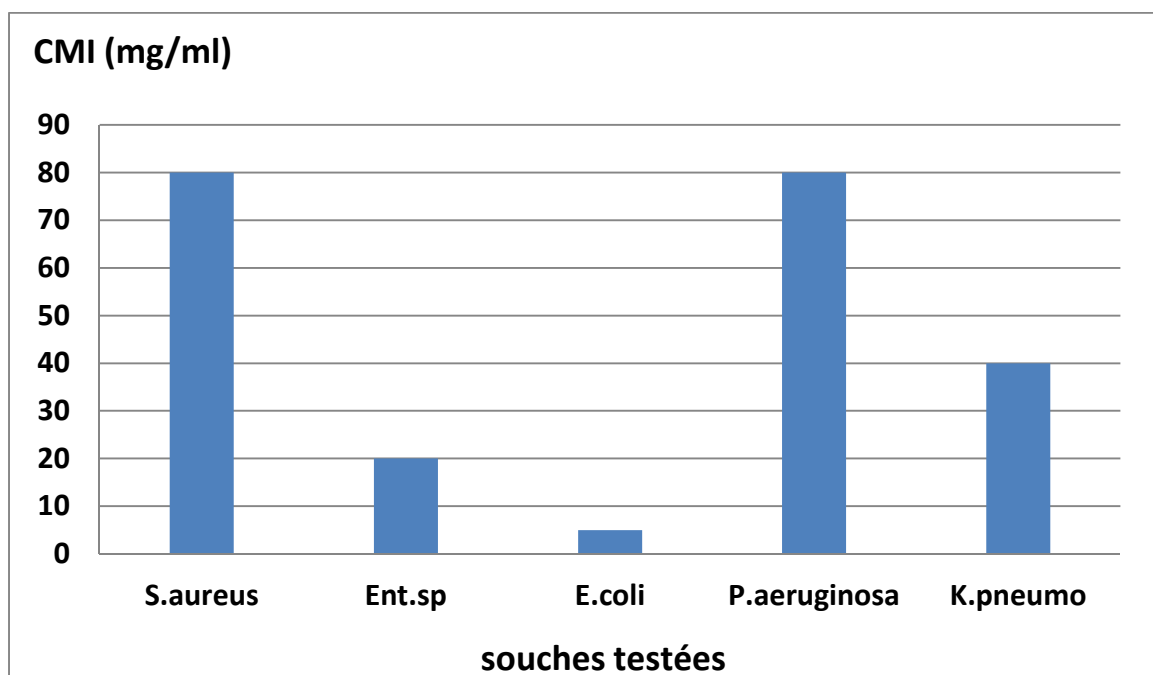
### 1.1.1.2. Détermination de la CMI

L'évaluation de la sensibilité bactérienne à l'HE de TH consiste à analyser la réponse bactérienne à des concentrations définies de cette HE. Cette approche a été déterminée en mesurant la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide, pour les cinq souches testées, en suivant la méthode réalisée par Bertella.A, (2019).

Les résultats sont représentés dans le tableau (9).

**Tableau 9 :** Résultats de la CMI des cinq souches bactériennes testées

Souches testées	IMC (mg/ml)
<i>S.aureus</i>	80
<i>Enterococcus sp</i>	20
<i>E.coli</i>	5
<i>P.aeruginosa</i>	80
<i>K.pneumoniae</i>	40



**Figure 34 :** Histogramme de la CMI des cinq souches bactériennes testées.

Les résultats de la CMI montre qu'en présence de l'HE de TH, les bactéries *S.aureus* et *P.aeruginosa* sont inhibées à la concentration 80mg/ml et c'est la concentration la plus élevée, *K.pneumoniae* est inhibée à 40mg/ml, par contre *Enterococcus sp* et *E.coli* sont inhibées à 20mg/ml et 5mg/ml respectivement.

### 1.1.1.3. Détermination de la CMB

La détermination de la CMB de l'HE de TH a été effectuée sur les bactéries ayant présenté une sensibilité par le test des CMI.

Les résultats sont listés dans le tableau 10

**Tableau 10** : Résultats de la CMB des souches bactériennes testées.

Bactéries	CMB (mg/ml)
<i>S.aureus</i>	+
<i>Enterococcus sp</i>	40
<i>E.coli</i>	20
<i>P.aeruginosa</i>	80
<i>K.pneumoniae</i>	80

Les résultats de la CMB confirment l'action inhibitrice de l'HE de TH sur *S.aureus* à 80mg/ml, par contre, elle présente une action bactéricide pour les souches *P.aeruginosa* et *K.pneumonia* à 80mg/ml, ainsi qu'elle a un effet bactéricide sur les souches *Enterococcus sp* et *E.coli* à 40mg/ml et 20mg/ml respectivement.

### 1.1.2. Résultats de l'activité antifongique

La recherche de l'activité antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes soumis en contact avec l'huile essentiel « TH » dans ce test on a effectué la méthode de l'aromatogramme (technique de diffusion en milieu solide)

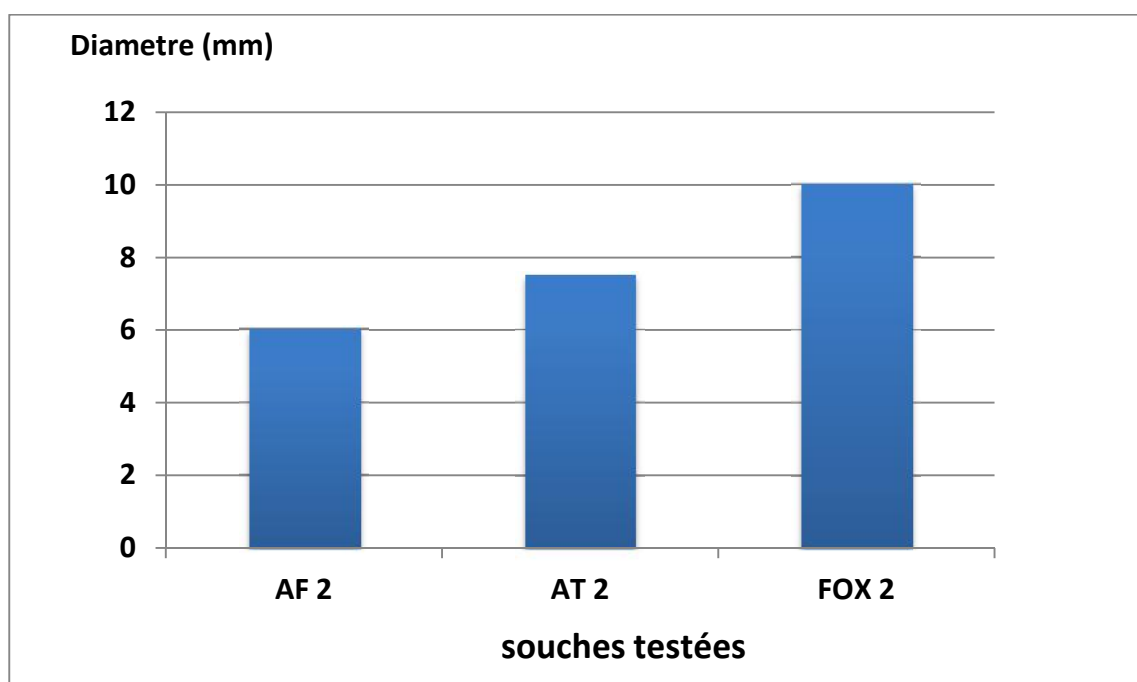
#### 1.1.2.1. L'aromatogramme

L'huile essentielle de *Thymus hirtus* willd. montre une activité antifongique moyenne, avec des zones d'inhibition ne dépassant pas 10mm les résultats dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Diamètre des zones d'inhibition des souches fongiques testées

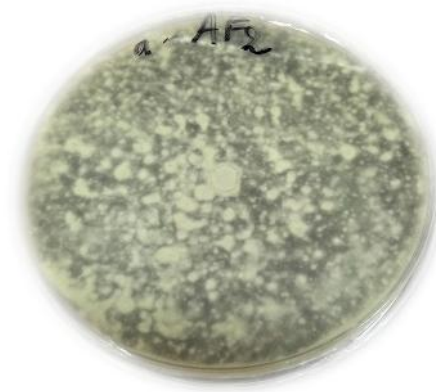
Souches	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Aspergillus fumigatus</i> 2 AF2	6 mm
<i>Aspergillus terreus</i> 2 AT2	7,5 mm
<i>Fusarium oxysporum</i> 2 FOX 2	10 mm

- à noter que le diamètre du disque de 6 mm est inclus dans le calcul de la zone inhibition.
- La (figure 35) montre l'histogramme des diamètres d'inhibition, de la prolifération fongique des souches testées.

**Figure 35** : Histogramme des diamètres d'inhibition des souches fongiques testées

Les informations obtenues relatives à l'étude qualitative de l'activité antifongique sont intéressantes. En effet l'huile essentielle de TH présente une activité antifongique pas mal.

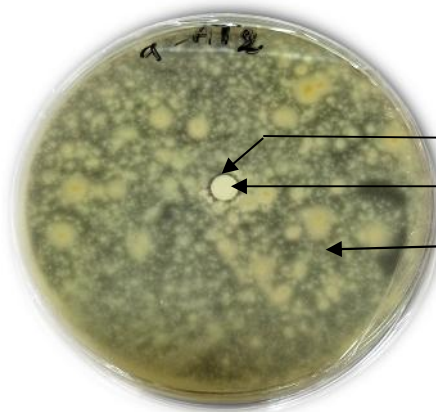
Le diamètre de la zone d'inhibition maximum est observé pour *Fusarium oxysporum* (10 mm), suivi de *Aspergillus terreus* (7,5 mm) et *Aspergillus fumigatus* (6mm). (Figure 36)



*Aspergillus fumigatus*



*Fusarium oxysporum*



- Zone d'inhibition
- Disque imbibé d'HE
- Croissance des champignons

*Aspergillus terreus*

**Figure 36 :** Zone d'inhibition des souches fongiques testées.

## 2. Discussion

### • Rendement

Dans notre travail le rendement est de 1.14%. On a remarqué que ce dernier est proche à celui trouvé par Alouache et al. (2017), qui a été 1.89% (Tala Guilef), 1.8% (Chellata), 2.93% (Ait ouabane), 1.2% (Tizi-nkouilet), 1.4% (Tikjda), tous de la plante *Thymus hirtus* récoltée de différentes régions, ainsi que l'extraction a été faite par hydrodistillation.

Cette différence de rendement en huile essentielle peut être due à la période de la récolte, car il y a des plantes cueillies au stade de la floraison, où le rendement a été supérieur à celui des plantes récoltées avant la floraison. D'autres facteurs peuvent être la cause de ces variabilités, comme l'origine botanique, la position géographique et les conditions environnementales (climat et sol) (Merghache et al., 2009)

Dans une autre étude sur le même genre *Thymus*, mais les espèces sont différentes, Kutta et al., (2007), ont trouvé un rendement moyen en HE de *T. pannonicus* et *T. vulgaris*, extraites par la technique des fluides supercritiques, qui était 0.34% et 0.42% respectivement.

Ces différences de rendement en HE pourraient être influencées par plusieurs facteurs, dont le temps et la technique d'extraction (Karoussou et al., 2005)

Notre résultat de rendement en HE est différent de celui obtenu par Boutiba.S, (2016), dont l'extraction de *Thymus inodorus* a donné un rendement de 0.7% et 5.1% pour *Thymus fontanesii*.

### • Activité antibactérienne

Les résultats de notre méthode de diffusion par disque montre que l'HE de TH exerce une activité antibactérienne inhibitrice sur les souches *E.coli*, *S.aureus* et *Enterococcus sp* avec une zone d'inhibition de 11.5 mm, 13.5 mm et 6 mm respectivement, par contre, *P.aeruginosa* n'en révèle aucune sensibilité.

Ces résultats sont semblables à ceux de zaghbi et al., (2013), qui ont montré une sensibilité plus importante des bactéries gram (-) comparé aux bactéries gram (+) vis-à-vis de l'huile essentielle de *thymus hirtus*. Ainsi qu'à ceux de Farah Haddouchi et al., (2009), qui ont indiqué que l'HE de *thymus fontanesii* constitue une exception de fait qu'elle est bactéricide contre les bactéries gram (-) et bactériostatiques contre les bactéries gram (+).

D'après la comparaison des résultats d'une étude menée par Aomari.L, (2018), on a remarqué que l'HE de *T.zygis* présente une importante action inhibitrice sur les trois bactéries *E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa*, avec des zones d'inhibition de 50 mm, 60 mm et 34 mm respectivement. Ainsi que L'HE de *T.capitatus* présente un pouvoir bactérien modéré sur

*S.aureus* avec une zone d'inhibition de 16 mm et fort sur les bactéries *P.aeruginosa* et *E.coli* avec des zones d'inhibition de 25 mm et 48 mm respectivement. Par contre, l'HE de *T.hirtus* est modérément inhibiteur de *S.aureus* et *E.coli* avec des zones d'inhibition de 14 mm et 12 mm et ne présente aucune action inhibitrice sur *P.aeruginosa*.

La différence d'activité entre les trois huiles essentielles vis-à-vis des souches testées, est probablement liée à plusieurs facteurs tels que : la composition chimique de l'huile, la saison de cueillette, la région de l'espèce, les conditions climatiques, la méthode d'extraction...etc.

Guesmi et al., (2014), ont étudié les activités antimicrobiennes de l'HE de *Thymus hirtus* ssp. *Algeriensis* ; leurs résultats ont indiqué que cette dernière possède un effet antibactérien.

Khadir et al. (2013), ont étudié l'huile essentielle de *Thymus lanceolatus*. Leurs résultats ont indiqué que cette plante a un grand potentiel en aromathérapie avec un effet antimicrobien remarquable et une efficacité d'extraction élevée.

Ben Bnina et al., (2009), ont étudié l'activité antimicrobienne de la partie aérienne et des fleurs de *Thymus hirtus* de Tunisie. Ils ont constaté que l'HE de la fleur et de la partie aérienne présentait un moyen à fort pouvoir antimicrobien contre les bactéries testées.

Khadir et al., (2016), ont analysé les activités biologiques de l'huile essentielle de *Thymus lanceolatus* (de Tlemcen, ouest de l'Algérie). Ils ont conclu que l'huile essentielle de cette plante présente une puissante activité antimicrobienne contre les bactéries Gram+.

Dans une autre étude menée par Noual et al., (2018), l'HE de *Thymus numidicus* a montré une activité antibactérienne par rapport à toutes les souches bactériennes testées, la concentration de 1% a été largement suffisante pour arrêter la croissance de *Staphylococcus aureus* (Gram +) et d'*Escherichia coli* (Gram -) par une zone d'inhibition de 10mm.

D'après la comparaison entre l'activité antibactérienne de l'HE de *T.fontanesii*, *T.inodorus* faite par Boutiba.S, (2016) et celle de *T.hirtus* Willd. qu'on a fait, l'HE de *T.fontanesii* montre un pouvoir antibactérien important sur les souches *S.aureus*, *P.aeruginosa* et *E.coli* avec des zones d'inhibition de 38 mm, 6 mm et 30 mm respectivement.

L'HE de *T.inodorus* montre une activité antibactérienne importante contre *S.aureus* avec une zone d'inhibition de 23 mm, et une moyenne activité contre *P.aeruginosa* et *E.coli* avec des zones d'inhibition de 6 mm et 7 mm respectivement. Par contre, l'HE de TH a une activité moyenne sur *S.aureus* et *E.coli* avec des zones d'inhibition de 13.5 mm et 11.5 mm respectivement et a une action sur *P.aeruginosa*.

La différence de ces résultats est probablement liée à la composition chimique, la méthode d'extraction, la zone géographique de la plante, ou même la différence des espèces... etc

La détermination de la CMI et de la CMB, a montré que l'HE de TH a un effet bactériostatique sur la bactérie *S.aureus* à 80 mg/ml, et bactéricide sur les bactéries *P.aeruginosa* et *K.pneumoniae* à 80 mg/ml, et *Enterococcus sp* et *E.coli* à 40 mg/ml et 20 mg/ml respectivement.

Dans l'étude de Boutiba.S, (2016), la CMI de l'HE de *T.fontanesii* était inhibitrice de la croissance bactérienne des souches *S.aureus*, *E.coli* et *K.pneumoniae* à 0.0625 mg/ml, 4 mg/ml et 2 mg/ml respectivement, par contre, l'HE de *T.hirtus* qu'on a étudié a été inhibitrice des mêmes souches à 80 mg/ml pour *S.aureus*, 5 mg/ml pour *E.coli* et 40 mg/ml pour *K.pneumoniae*.

Cette différence de l'activité antibactérienne des HE des deux plantes peut être due aux différents agents chimiques présents dans ces dernières. (Marjorie, 1999).

- **L'activité antifongique**

Nos résultats de l'activité antifongique semblent différents de ceux de Athamnia et al., (2018), dont l'inhibition de la croissance d'*Aspergillus niger* par l'HE de *T.capitatus* est très forte, autrement dit, exagérée où il n'y avait aucune croissance bactérienne, vis-à-vis l'inhibition de la croissance d'*Aspergillus terreus* par l'HE de *T.hirtus* réalisé dans notre expérimentation. (7.5 mm ).

Ben Bnina et al., (2009), ont étudié l'activité antimicrobienne de la partie aérienne et des fleurs de *Thymus hirtus* de Tunisie. Les résultats ont indiqué que les effets antifongiques de cette dernière sur les espèces phytopathogènes ont intéressants.

*Conclusion*  
*générale*

## Conclusion générale

De nombreuses bactéries sont devenues, avec le temps, résistantes aux antibiotiques. Il n'est donc pas toujours évident de trouver l'antibiotique qui sera efficace pour traiter une souche bactérienne donnée. (Abdelli, 2017).

Le genre *Thymus* fait partie des plantes aromatiques connu par sa richesse en huiles essentielles qui lui donnent une variété biologique importante, ce qui nous a poussé à nous intéresser à l'extraction de l'HE de la plante *Thymus hirtus* Willd. et la mise en évidence de son effet antimicrobien.

L'extraction de l'HE de TH a été faite par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger modifié avec un rendement de 0.02%.

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne de l'HE de TH par la méthode de l'aromatogramme varient d'une souche à l'autre. On a remarqué un pouvoir antibactérien modéré sur les souches d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibition variantes entre 11 mm et 14 mm respectivement, et absence de l'action antibactérienne sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Une activité antifongique faible sur les souches *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus* et *fusarium oxysporum* avec une zone d'inhibition qui ne dépasse pas 10 mm.

La méthode de la CMI confirme une faible sensibilité des souches *E.coli* et *S.aureus*, par contre *P.aeruginosa* s'est avérée résistante.

Les résultats obtenus nous ont montré un pouvoir antibactérien modéré de l'HE de TH, mais ça ne nous empêchent pas de mener des études plus approfondies comme :

- L'utilisation d'autres techniques d'extraction et d'analyses plus sophistiquées.
- L'étude de l'activité antimicrobienne par des méthodes automatisées, permettant ainsi un gain de temps et une exploitation plus fiable du pouvoir antimicrobien sur plusieurs souches.
- L'utilisation d'une large gamme des souches pour les tests.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographique



- Abdelli.W. Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris* [thèse]. MOSTAGANEM : UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS, 2017.
- Agostini, Fabiana, et al. "Essential oil yield and composition of Lamiaceae species growing in Southern Brazil." *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52.2 (2009): 473-478.
- Aissani.F. Analyse sensorielle de la viande bovine additionnée aux huiles essentielles *Thymus ciliatus* (Zaitra) et *Ammoides verticillata* (Nunkha). [Mémoire]. Tlemcen : Université ABOUBAKER BELKAID, 2015.
- Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Bakkali, M., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R., Conchello, P. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco: Antimicrobial activity of Moroccan essential oils. *J. Sci. Food Agric.* 91, 2643–2651. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4505>. 2011.
- Alouache.F, S. Benmeziane, and M.E. Rahmani-Berboucha, Etude comparative des activités biologiques des huiles essentielles et extraits volatiles (CO<sub>2</sub> supercritique) de plantes aromatiques du genre *Thymus*. Mémoire de Master. Université de Béjaïa. 2017.
- Aprotosoiaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Farmacia*, 58 (1). pp. 46-54Ed. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 623p. (2010).
- Athamnia I, Djaibet C, Zeghdoud G. Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. et du *Thymus capitatus* L. sur des agents d'otomycose : Cas d'*Aspergillus niger*. Mémoire de Master. Département de biologie. Université de Guelma. pp 23. 2018.



- Bajpai, V.K., Shukla, S. et Sharma, A. "Essential oils as antimicrobial agents". Chap 132. Dans: Ramawat, K. G. et Mérillon, J. M. (eds). *Natural products*. Edition : Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. P : 3975-3988. (2013).

- Barbosa, J.P., Rossini de Oliveira, T., Bragado Puppim, D.G.P., Teixeira, A.L., Cláudia Boni, G., Busato de Feiria, S.N. , Buso-Ramos, M.M. et Höfling, F.J. (2019). Eucalyptus spp : Candida albicans Antibiofilm Activity. EC Dental Science, Vol n°18. P : 824-840.
- Belaiche.P., 1979, "l'aromatogramme". Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. M. S. A. Editeur, Paris. Tome 1, 204.
- Ben Bnina E, Hammami S, Daami-Remadi M, et al (2009) Composition and antimicrobial activities of essential oils from the aerial parts and flowers of *Thymus hirtus* W. growing in Tunisia. J Essent Oil Bear Plants 21:567–72.
- Benayache, F., Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret.
- Bentayeb A., Djemmal S., 2014. Contribution à la mise en évidence in vitro de l'efficacité des huiles essentielles de *thymus ciliatus* et *thymus dreatensis* contre les champignons lignivores, thèse de master en microbiologie, université Constantine 1, p 4-10.
- Bertella.A. Etude de l'activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba*, *Artemisia compestris* et *Rosmarinus tournefortii*. Thèse de Doctorat. Microbiologie appliquée. Université d'Oran. 2019.
- Billerbeck V-G. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques-Phytothérapie ; Vol.5 ; pp 249-253. 2007.
- Bouaoun D, Hilan C, Garabeth F, Sfeir R-Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss-Phytothérapie ; Vol.5 ; pp 129-134. 2007.
- Bouguerra, A., Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *foeniculum vulgare* Mill. 2012.
- Boukhatem, M.N., Ferhat, A. et Kameli, A. (2019). Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : revue de littérature. Agrobiologia, Vol n°9. P: 1653-1659.
- Boutiba.S. Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne des extraits de *Thymus inodorus* Desf. Mémoire de Master. Université de Tlemcen. 2016.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J. et Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. Lavoisier SAS. Doi : <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1118-z>.
- Bruneton, J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème édition. Edition Tec & Doc, Lavoisier. (2009).

- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int. J. Food Microbiol* , 94, 223-253. (2004)



- Caissard J.C., Joly C., Bergougnoux V., Hugueney P., Mauriat M., Baudino S. Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. *Recent Research Developments in Cell Biology*, 2 : 1-15, 2004.
- Carlos de O Costa V, Tavares JF, Silva AB, et al (2014) Hyptenolide, a new a-pyrone with spasmolytic activity from *Hyptis macrostachys*. *Phytochem Lett* 8:32–37.
- Carson F. A. et Hammer K. (2011). *Chemistry and Bioactivity of Essential Oils*. In: *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. (Ed. Thormar H.). John Wiley & Sons. Islande. 336p.
- Chebaibi A., et al. (2016) Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytotherapie*, 14(6):355-362.
- Chemat F, Abert-Vian , M . Fernandez ,X( 2013 ) .Microwave assisted extraction of essential oil and aroms .In *Microwave assisted Extraction for bioactive Compounds* (pp.53-68), Springer US.
- Chemloul, F., Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* de la région de Tlemcen. 2014.
- Chibani, S., Etude phytochimique et biologique de six plantes médicinales de l'est Algerien. 2013.
- Chikhouné, A., Huiles essentielles de thym et d'origan. 2007, INA.
- CHIKHOUNE A., 2007. Huiles essentielles de thym et d'origan étude de la composition chimique, de l'activité antioxydant et antimicrobienne, thèse de magister en agronomie, institut national agronomique El Harrach-Alger, p 12-25.
- Conn. V.M. (2005). *Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis*. Thèse de Doctorat. Flinders University
- Conner D. E. (1993). Naturally occurring compounds. In Davidson P. M.; Branen A. L. *Antimicrobials in foods*, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp. 441-468.
- Couic-Marinier, F. A. Lobstein (2013) Mode d'utilisation des huiles essentielles. *Actual pharm*; 52 (525): 26-30.
- Cusson C. *L'Aromathérapie & Les huiles essentielles* [Livre En ligne]. 2007 [consulté en Mars 2018]. Disponible sur : <http://www.doc-developpement-durable.org>.

## D

- DAOUDI F., 2016. Analyse chimique et propriétés biologiques des huiles essentielles de *Chiliadenus rupestris* et *Thymus coloratus* (Zaater) de la région de Tlemcen, thèse de master en chimie, Université ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCEM, p7-11.
- Degryse A., Delpha I., Voinier M. (2008). Risque et bénéfices possible des huiles essentielles, ingénieurs de génie sanitaire, Atelier de santé environnement.
- Delaigne R., 1930. Les essences naturelles et parfums, Ed. Armond colin, Paris
- Dick A.J. et Starmans H.H.N., (1996). Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 191-197.
- Dorman H.J.D, et Deans S.G-Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils-*Journal of Applied Microbiology*; Vol.88; N°2, pp 308-316. 2000.
- Doughari J.H, Obidah J.S-In vitro antifungal activity of stem bark extract of *Leptadenia lancifolia*-*International Journal of Integrative Biology*, Vol.3; N°2; pp 111.2008.
- Drouet E. Le monde microbien : partie1 : Microbes et microbiologie [cour], consulté le février 2018 disponible sur [www.medatice-grenoble.fr](http://www.medatice-grenoble.fr).
- Dupont, F., and J. L. Guignard. "Abrégés de pharmacie. Botanique, les familles de plantes. (15e édn)." (2012).

## E

- Elhaib A. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytique [thèse] Toulouse : Université de Toulouse. 2011.

## F

- Faucon M. *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale. Sang de la terre* (2012). 880p.
- Fekih, N., *Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre pinus poussant en algérie*. 2015.
- Feng W et Zheng X- Essential oils to control *Alternaria alternaria* in vitro and in vivo- *Food control*; Vol.18; pp 1126-1130. 2007.
- Fernandez X., Chemat F. *La chimie des huiles essentielles*. Editions Vuibert 2012). 288p.

- Fernandez, X., La chimie des huiles essentielles : Tradition et innovation. 2017 : Vuibert.
- De Lima, S.G., Medeiros, L.B.P., Cunha, C.N.L.C., Silva, D.D., de Andrade, N.C., Neto, J.M. Moita., Lopes, J.A.D., Steffen, R.A., Araújo, B.Q., Reis, F., De A.M. (2012). Chemical composition of essential oils of *Croton hirtus* L'Her from Piauí (Brazil). *J. Essent. Oil Research*. 24(4): 371-376.
- Franchome P., Pénéol D. et al., 1990. Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique : matière, énergie, information. *L'aromathérapie exactement* .R.J. Editeur. Limoges. 2, 73 -227.
- Franchome P., Jollois R., Pénéol D. *L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles*. Editions Jollois, 2001. (Figure : Exemple d'aromatogramme).
- Franchomme P., Pénéol D. *L'aromathérapie exactement*. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jollois (2001). 445p.
- Friedland D., 1975. Industrie américaine des substances aromatiques. *Informations chimie*, 140, 65-68.
- François Denis, M.-C.P., Christian Martin, Vincent Cattoir, *Bactériologie Médicale Techniques usuelles*. 3<sup>ème</sup> ed. 2016.



- Gayathri A; Madhanraj P; and Panneerselvam A. 2011. Diversity, Antibacterial Activity And Molecular Characterization of Actinomycetes Isolated From Salt Pan Region of Kodiakarai, Nagapattinam DT. *Asian J. Pharm. Tech*. Vol: 1. N° 3. Pp: 79-81.
- Glordani R, Kaloustian J-Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques-Phytothérapie ; Vol. 3 ; pp 121-124. 2006.
- Grysole J. (2005). La commercialisation des huiles essentielles in *Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique : Chapitre 07*. Corporation LASEVE (laboratoire d'analyse. et de séparation. des essences. végétales), Québec, pp.139-162.
- Guesmi et al. (2014), ont étudié les activités antimicrobiennes de l'HE de *Thymus hirtus* ssp. *algeriensis*; leurs résultats ont indiqué que cette dernière possède un effet antibactérien.

- Guesmi F, Ben Farhat M, Mejri M, et al (2014) In-vitro assessment of antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of *Thymus hirtus* ssp. *algeriensis*. *Lipids Health Dis* 13:114–26.
- Guinoiseau E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat pour l'obtention du grade de docteur de l'université de Corse. Ecole Doctorale Environnement et Société UMR CNRS 6134 SPE. 148p.



- Haddouche Kh., 2011. Étude de l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus*, thèse de master en sciences des aliments, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, p19-22.
- Haddouchi, F., et al., Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science : Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 2009. 5(2).
- Howard L.. Tomato leaf (non-datée, Dartmouth college, Hanover, États-Unis). Photographie en microscopie électronique à balayage. In Ripple Electron Microscope Facility. Disponible sur : <http://remf.dartmouth.edu/images/TomatoLeafSEM/tomatoleafsemcatalog.html> (consulté le 07/02/2017).



- Ilbert, H., et al., eds. Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie. *Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches*. Vol. 73. 2016, Montpellier : CIHEAM / FranceAgriMer. 222.



- Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L, Vergnes MF-Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne-Phytothérapie ; Vol.6 ; pp 160-164. 2008.

- Kaloustian J., Hadji-Minaglou F. La connaissance des huiles essentielles. Qualitologie et aromathérapie. Springer (2012). 210p.
- Karousou, R., Koureas, D. N., & Kokkini, S. (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*, 66(22), 2668-2673.
- Khadir et al. (2013), ont étudié l'huile essentielle de *Thymus lanceolatus*. Leurs résultats ont indiqué que cette plante a un grand potentiel en aromathérapie avec un effet antimicrobien remarquable et une efficacité d'extraction élevée.
- Khadir A, Bendahou M, Benbelaid F, et al (2013) Pouvoir antimicrobien de *Thymus lanceolatus* Desf., récolté en Algérie. *Phytoterapia* 11:353–8
- Khadir et al. (2016), ont analysé les activités biologiques de l'huile essentielle de *Thymus lanceolatus* (de Tlemcen, ouest de l'Algérie). Ils ont conclu que l'huile essentielle de cette plante présente une puissante activité antimicrobienne contre les bactéries Gram+.
- Khadir A, Sobeh M, Gad H, et al (2016) Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Thymus lanceolatus*. *Z Naturforsch C Bio Sci* 71:155–6
- Khandelwal, K. (2008). *Practical pharmacognosy*. Pragati Books. [15]. Serrato-Valenti, G., Bisio, A., Cornara, L., & Ciarallo, G. (1997). Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany*, 79(3), 329-336.
- Klaric M.S, Kosalec I, Mastelic J, Pieckova E, Pepeljnak S-Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings- *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 44 ; N°1 ; pp 36-42.2006.
- Krimat S, Dob T, Toumi M, et al (2015) Assessment of phytochemicals, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of *Salvia chudaiei* Batt. et Trab. endemic medicinal plant from Algeria. *J Mater Environ Sci* 6:70–8.
- Ksouri A, Dob T, Belkebir A, et al (2017) Volatile compounds and biological activities of aerial parts of *Pituranthos scoparius* (Coss and Dur) Schinz (Apiaceae) from Hoggar, southern Algeria. *Trop J Pharm Res* 16:51–8.
- Kutta, G., & Sz, S. (2007). Yield and composition of supercritical fluid extracts of different Lamiaceae herbs. *International Journal of Horticultural Science*, 13(2), 79-82.



- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(6), 435-448.
- Laouer H, Boulaacheb N, Akkal S, et al (2006) Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem* 54:1822–8.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2014). Essential oils: from conventional to green extraction. In *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry* (pp. 9-20). Springer International Publishing.
- Louarn P., 1994. Guide pratique de l'aromathérapie : Mieux être, mieux vivre par l'aromathérapie. Ed De Vecchis S.A., Paris, 138.
- Ložien , K., J. Vai i nien , and P.R. Venskutonis, Chemical composition of the essential oil of creeping thyme (*Thymus serpyllum* sl) growing wild in Lithuania. *Planta medica*, 1998. 64(08): p. 772-773.



- Maffei, M., Chialva, F., & Sacco, T. (1989). Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves. *New Phytologist*, 111(4), 707-716.
- Mailhebiau P., 1994. La nouvelle aromathérapie : biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne, 635.
- Maksimovi Z, Milenkovi M, Vu i vi D, Riti M-Chemical composition and anticicrobial activity of *Thymus pannonicus* All. (Lamiaceae) essential oil-Cent Eur ; *J.Biol* ; Vol. 3 ; N°2 ; pp 149-154.2008.
- Marjorie M. C. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*.564-582.
- Martini, M. C. (2011). Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. [http://www.lavoisier, fr/](http://www.lavoisier.fr/).
- Mebarki, N., Extraction de l'huile essentielle de *thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse antimicrobienne. 2010.
- Merghache, S., Hamza, M., & Tabti, B. (2009). Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. De Tlemcen, Algérie. *Afrique Science : Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 5(1).

- Mnayer, D., Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. 2014, Université d'Avignon.
- Muther L. Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant [thèse].Faculté de pharmacie de Clermont Ferrand, 2015.



- Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi Motamed S, et al (2005) Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. Iran J Pharm Res 4:63–7.
- Noual.N, Madi.D. Etude de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus numidicus*. Mémoire de Master. Université de Bouira. 2018.
- Nouasri A, Dob T, Toumi M, et al (2015) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus lanceolatus* Desf., an endemic thyme from Algeria. J Essent Oil Bear Plants 18:1246–52.



- Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Naghdibadi H- Antifungal activity of Thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus xavus* in liquid medium and tomato paste-Food Control ; Article in press.2007.
- Ouis N. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil [thèse]. Université d'Oran, 2015.
- Ouraïni D, Agoumi A, Alaoui M.I, Alaoui K, Cherrah M.A, Belabbas M.A-Activité antifongique de l'acide oléique etr des huiles essentielles de *Thymus satireijoïdes* L. et de *Mentha pulegium* L, comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques-Phytothérapie ; Vol.1 ; pp6-14.2007.
- Oussala M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M-Antimicrobial effects of selected plant essential oilson the growth of *Pseudomonas putida* strain isolated from meat-Meat Sicence ; Vol. 73 ; pp 236-244.2006.



- Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., & Zachariah, T. J. (2008). Chemistry of spices. Édition CABI, Londres, Royaume-Uni.

- Pibiri M.C., 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen des huiles essentielles. Thèse Doctorat, Lausanne, Canada, 177.
- Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Consalves M.J, Costa-de-Oliveira S, Palmeira A, Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Journal of Medical Microbiology* ; Vol. 55 ; pp 1367-1373. 2006.



- Quézel, P. and S. Santa, 1962-1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris. 2.



- Rassem H. H. A., Nour A. H., Yunus R. M., (2016). Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 10(16), 117-127.
- Raynaud J. Prescription et conseil en aromathérapie. Paris, Lavoisier, 2006.
- Razzaghi-Abyaneh M., Shams-Ghahfarokhi M., Rezaee M-B., Jaimand K., Alinezhad S., Rehan T, Tahira R, Rehan T, et al (2014) Screening of seven medicinal plants of family Lamiaceae for total phenolics, flavonoids and antioxidant activity. *Pakhtunkhwa J Life Sci* 2:107–17
- Reynaud, J. (2011). Comprendre la botanique : histoire, évolution, systématique. Edition ellipses.
- Rahman A., Shanta Z. S., Rashid M.A., Parvin T., Afrin S., Khatun M. K., Sattar M.A., (2016). In vitro antibacterial properties of essential oil and organic extracts of *Premna integrifolia* Linn. *Arab. J. Chem.*, 9, 475-479.
- Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat, Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté des Sciences Dhar Mehraz, Fès.
- Richter, J., & Schellenberg, I. (2007). Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(6), 2207-2217.

- Roux, D., & Catier, O. (2007). Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. Wolters Kluwer, France.



- Saberi R., Yoshinari T., (2009). Chemical composition and anti aflatoxigenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control*, 20, 1018-1024.
- Sacchetti G, Maiettis S, Muzzol M, Scolianti M, Manfredinis S, Radice M, Bruni R- Comparative evaluation of 11 essential oils of different origins functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods-Food Chemistry ; Vol. 91 ; pp 621-632.2005.
- Saidj, F., Extraction des essences du thymus numedius kabylliica. 2007, Université M'hamed Bougara de Boumerdès.
- Salle J-L. Les huiles essentielles - Synthèse d'aromathérapie, 2ème édition. Paris, Frison-Roche, 2004.
- Sallé, J. L. (1991). Le totum en phytothérapie, approche de la phyto-biothérapie. Edition FrisonRoche, Paris, France. [19]. Shiva, M. P., Lehri, A., & Shiva, A. (2002). Aromatic & medicinal plants: yielding essential oil for pharmaceutical, perfumery, cosmetic industries and trade. International Book Distributors, Dehradun, Inde
- Shaaban H. A. E., El-Ghorab A. H., Shibamotoand T., (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *J. Ess. Oil Res.*, 24(2), 203-212.
- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269 : 8022-8028.
- Spichiger, R. E. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. PPUR Presses Polytechniques, Lausanne, Suisse.
- Suhr K.I., Nielsen P.V. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi.*J.Appl. Microbial.* Vol. 94 : pp 665-674. 2003.
- Svoboda K.P., Svoboda T.G., Syred A. Secretory structures of aromatic and medicinal plants. *Microscopix Publications* (2000). 60p.
- Swamy, M.K., Akhtar, M.S. et Sinniah, U.R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol n°2016. Hindawi. P:1-21.



- Valnet J. Aromathérapie, 11ème édition. Paris, Vigot, 2003.
- Vernin G., Merad O., Vernin G.M.F., Zamkotsian R.M., Parkanyi C., (1995). GC-MS Analysis of Artemisia herba alba Asso Essential Oils from Algeria. Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence. 147-205.
- Véron M. 1990. Pseudomonaceae. In : Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale. Medecine-Sciences.Flammation. France. Ch. 22: 555-587.



- Zeghib, A., Etude phytochimique et activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale d'extraits et d'huiles essentielles de quatre espèces endémiques du genre Thymus. 2013.

# ***Annexes***

**Annexe 1:** Composition des milieux de culture utilisés pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique.

<b>Gélose nutritive "Nutrient agar" (ISO-6579 ISO-10273 ISO 19250)</b>	
Gélatine Peptone	5,0 g
Extrait de bœuf	3,0 g
Gélose bactériologique	15,0 g
L'eau distillée	1L
pH final: $6,8 \pm 0,2$ à $25^{\circ} \text{C}$	

<b>Bouillon Mueller Hinton " Mueller Hinton Broth "</b>	
Peptone de caséine acide (H)	17,5 g
Infusion de bœuf	20 g
Fécule de maïs	15 g
L'eau distillée	1L
pH final: $7,4 \pm 0,2$ à $25^{\circ} \text{C}$	

<b>Gélué Mueller Hinton "Mueller Hinton Agar "</b>	
Peptone de caséine acide (H)	17,5 g
Bœuf Infusion	2:0 g
Amidon	1,5 g
Gélose bactériologique	17,0 g
L'eau distillée	1L
pH $7.4 \pm 0.2$ at $25^{\circ} \text{C}$	

<b>Bouillon nutritif " Nutrient broth "</b>	
Gélatine Peptone	5,0 g
Extrait de bœuf	3,0 g
L'eau distillée	1L
pH final: $6,8 \pm 0,2$ à $25^{\circ} \text{C}$	

## Annexe 2 : Préparation des milieux de culture utilisés

### **Gélose nutritive**

Mettre en suspension 23 grammes du milieu dans un litre d'eau distillée.

Bien mélanger et dissoudre en chauffant avec une agitation fréquente.

Faire bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complète.

Distribuer dans des récipients appropriés et stériliser en autoclave à 121° C pendant 15 minutes

### **Bouillon Mueller Hinton**

Mettre en suspension 21 grammes de milieu dans un litre d'eau distillée

Stériliser à l'autoclave un 121C pendant 15 minutes NE PAS SURCHAUFFER

Chauffer en agitant fréquemment et faire bouillir une minute

### **Gélule Mueller Hinton**

Suspendre 38 grammes de milieu dans un litre d'eau distillée.

Bien mélanger et dissoudre en chauffant avec agitation fréquente Faire bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complète.

Distribuer dans des contenants appropriés et stérilise en autoclave à 121 C pendant 15 minutes

Refroidir à 45 ou 50 C et ajouter du sang si désiré.

Le mélange de sang doit être chauffé au chocolat à 80°C pendant 10 minutes

Ne pas surchauffer pour refondre le milieu froid, chauffer le plus brièvement possible.

### **Bouillon nutritif**

Mettre en suspension 8 grammes du milieu dans un litre d'eau distillée, bien mélanger.

Faire bouillir pendant une à deux minutes jusqu'à dissolution complète

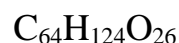
Répartir et stériliser à l'autoclave un 121C pendant 15 minutes

**Annexe 3** : Les réactifs et les solvants utilisés**Chlorure de tétrazolium**

Le chlorure de triphényltétrazolium (TTC), souvent appelé chlorure de tétrazolium, est un indicateur rédox couramment utilisé en biochimie et en biologie moléculaire afin notamment de mettre en évidence la respiration cellulaire.

Formule**Tween 80**

Le polysorbate 80 « Tween 80 » est un tensioactif non ionique et un émulsifiant souvent utilisé dans les aliments et les cosmétiques. Ce composé synthétique est un liquide jaune visqueux et soluble dans l'eau.

Formule

<u>Ingrédients</u>	
Wt.per ml at 20°C	1.077-1.081g
Acid value	Max 2.0
Hydroxyl value	65-80
Saponification value	45-55
Water (KF) %	Max 2.0

**Diméthylsulfoxyde DMSO**

Le diméthylsulfoxyde noté aussi DMSO est un solvant polaire organosulfuré, aprotique, de formule  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ .

Il se présente comme un liquide incolore, qui dissout à la fois des composés polaires et non-polaires, et qui est miscible dans une large gamme de solvants organiques, ainsi que dans l'eau

Formule

## L'eau physiologique

Parfois appelé sérum physiologique ou solution physiologique, est un liquide limpide au goût salé. Il se présente sous différentes formes et différents formats.

La solution est généralement composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (NaCl) dilué à 9 pour 1 000 (c'est-à-dire une solution à 0,9 % de masse/volume de NaCl, soit 9 g/l).

## Sulfate de Sodium

Le sulfate de sodium est un composé chimique courant formé d'un ion sulfate et de deux ions sodium. Lorsqu'il est à l'état anhydre, il prend l'apparence d'un solide cristallin blanc de formule chimique  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dont la forme naturelle est la thénardite des minéralogistes.

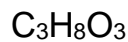
Formule



## Glycérol

Le glycérol, ou glycérine, est un composé chimique de formule  $\text{HOH}_2\text{C}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ . C'est un liquide incolore, visqueux et inodore au goût sucré, utilisé dans de nombreuses compositions pharmaceutiques.

Formule



## Annexe 4: Les antibiotiques

Antibiotiques	Sigle	Charge du disque (µg)
Amoxicilline + Acide Clavulanique	AMC	30
Cefoxitine	FOX	30
kanamycine	AKN	30
Acide nalidixique	NAL	30
furanes	FTN	300
Ciprofloxacine	CIP	5
Sulfaméthoxazole-trimethoprim	SXT	25
Fosfomycine	FOS	200
Ertapenem	ETP	10
Cefazolin	CZN	30
Ampicilline	AMP	10
gentamicine	GMN	10
Aztréonam	ATM	30
imipénème	IPM	10
Vancomycine	VA	30
acide fusidique	FA	10
Tétracycline	TE	30
Levofloxacin	LVX	5
Teicoplanin	TEC	30
Cefotaxime	CTX	30

**Annexe 5 :** Liste des principales espèces du thymus en Algérie (Quezel et Santa, 1963).

Espèce	Localisation et caractéristique
<i>Thymus pallescens</i> (Boiss. et Reuter)	- commun dans le tell - endémique algérien.
<i>Thymus capitatus</i> (L.) (Hoffmann et Link.)	très rare dans le sous secteur de l'Atlas tellien
<i>Thymus dreatensis</i> Batt.	très rare dans le sous secteur du Tell constantinois et de la petite Kabylie.
<i>Thymus Numidicus</i> (Poiret)	assez rare dans : le sous secteur de l'atlas tellien, le secteur du Tell constantinois et petite et grande Kabylie.
<i>Thymus guyonii</i> (De Noé)	rare dans : le sous secteur des Hauts plateaux algérois, oranais et Constantinois.
<i>Thymus Lanceolatus</i> (Desf.)	rare dans - le sous secteur de l'Atlas tellien (Terni) et de l'Atlas Tellien (Médéa, Benchicao). - le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais (Tiaret) et Sour El Ghozlane (Aumale).
<i>Thymus pallidus</i> (Coss.)	très rare dans le sous secteur de l'Atlas saharien Constantinois.
<i>Thymus glandulosis</i> (Lag.)	très rare dans le sous secteur des Hauts plateaux algérois et oranais.
<i>Thymus hirtus</i> (Willd.)	commun sauf sur le littoral
<i>Thymus algériensis</i> (Boiss. et Reuter)	très commun dans toutes les régions montagneuses et rares ailleurs.
<i>Thymus munbyanus</i> (Desf.)	endémique dans le nord du secteur algérois

### Annexe 6 : Identification thymol extrait

Toutes les méthodes d'analyse et les formules présentées dans ce paragraphe proviennent du recueil de **pharmacopée européenne 4eme édition**.

Point de fusion

Point d'ébullition

Le thymol peut se caractériser qualitativement par :

**Réaction 1** : en ajoutant à la solution aqueuse de thymol un demi - volume d'acide acétique glacial et ensuite, après mélange. 1 volume d'acide sulfurique monohydrate : si on est en présence de thymol. La solution se colore en rouge

**Réaction 2** : Dissoudrez 0.2g de thymol dans 2 ml de solution alcalin diluée d'hydroxyde de Na, ajoutez 0 2 ml de chloroforme et chauffez au bain marie, la présence de thymol s'identifie par l'apparition d'une coloration violette

**Réaction 3** : Dissolvez 2 ml environ de thymol dans Em d'acide acétique antydns ajoutez 0.15 ml d'acide sulfurique 0.05 ml d'acide nitrique, il apparait une colorationt vent bleu en présence de thymel

**Annexe 7 :** Les principales huiles essentielles antibactériennes (Kaloustian et al., 2012)

<b>Dénomination latine</b>	<b>Plante et type d'extrait et partie utilisée</b>	<b>Molécule(s) d'intérêt</b>	<b>Précaution</b>
<b>Cinnamomum verum J. Presl.</b>	HE cannelle écorce	Cinnamaldéhyde, eugénol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<b>Cinnamomum verum J. Presl.</b>	HE cannelle feuille	Eugénol, alcool cinnamique	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important). Attention per os, l'eugénol est un antiagrégant plaquettaire
<b>Eugenia caryophyllata Thumb.</b>	HE girofle clou, griffe et feuille	Eugénol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important). Attention per os, l'eugénol est un antiagrégant plaquettaire)
<b>Satureja montana L.</b>	HE sarriette des montagnes sommité fleurie	Carvacrol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<b>Satureja hortensis L.</b>	HE sarriette des jardins sommité fleurie	Carvacrol, thymol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<b>Origanum compactum Bentham</b>	HE origan compacte partie aérienne	Carvacrol, thymol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<b>Origanum vulgare L.</b>	HE origan d'Europe partie aérienne	Carvacrol, linalol, thymol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<b>Thymus vulgaris L.</b>	HE thym et thymol sommité fleurie	Thymol, carvacrol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<b>Thymus vulgaris L.</b>	HE thym et carvacrol sommité fleurie	Carvacrol, thymol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<b>Thymus capitatus Hoffm &amp; Link</b>	HE origan d'Espagne	Carvacrol, linalol, bornéol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)

**Annexe 8 :** Les principales huiles essentielles antifongiques (Kaloustian et al., 2012)

Dénomination latine	Plante et type d'extrait	Molécule(s) d'intérêt	Précaution
<b>Cuminum cyminum L.</b>	HE cumin semence	Cuminaldéhyde	Aucune connue
<b>Cymbogon citratus (DC) Stapf et Cymbopogon flexuosus Stapf.</b>	HE laurier d'Appolon Rameau fraîchement taillé	1,8-cinéole, linalol, terpinène-4-ol, terpinéol a	Utiliser avec prudence chez l'enfant de moins de 7 ans. Interdit avant l'âge de 36 mois.
<b>Eucalyptus citriodora Hook.f.</b>	HE lemon-grass	Citral (géraniol + néral)	Aucune connue
<b>Coriandrum sativum L.</b>	HE eucalyptus citronné rameau fraîchement taillé	Citronellal, citronellol, géraniol, linalol	Aucune connue
<b>Pelargonium graveolens l'Herit. Ex Aiton</b>	HE coriandre semence	Linalol	Aucune connue
<b>Mentha suaveolens</b>	HE géraniol partie aérienne	Quelle que soit l'origine - citronellol, géraniol, linalol, terpinéol a	Aucune connue
<b>Melaleuca leucadendron L.</b>	HE menthe suave partie aérienne fleurie	Pipériténone oxyde	Éviter per os
<b>Melaleuca quinquenevia (Cav.) ST Blake</b>	HE cajeput rameaux fraîchement taillés	1,8-cinéole + terpinéol a. Il existe un chémotype à platyphyllol, extrêmement actif.	Utiliser avec prudence chez l'enfant de moins de 7 ans, Interdit avant l'âge de 36 mois
<b>Litsea cubeba (Lour.) Persoon</b>	HE litsée citronnée fruit	1,8-cinéole + terpinéol a Citral, citronellol, linalol, citronellal	Aucune connue
<b>Commiphora myrrha (Ness) Engler var. molmol</b>	HE myrrhe amère	furanosesquiterpène	Aucune connue
<b>Cymbopogon martini Stapf. Var motia</b>	HE palmarosa	Géraniol, linalol nes	Aucune connue
<b>Ocimum sanctum</b>	HE Tulsi partie aérienne fleurie	Eugénol, méthyl eugénol, méthyl chavicol	Aucune connue Pourrait néanmoins s'avérer caustique pour la peau et les muqueuses (choix galénique important)

***FIN***