



République Algérienne Démocratique et Populaire.
Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Département de Biologie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté par

Mlle Moulay Ahlem

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Microbiologie Fondamentale

THEME

**Activité antibactérienne des huiles essentielles de
Thymus vulgaris :Analyse de deux articles**

DEVANT LE JURY

Présidente : Mme. Ait Chaabane L.

Examinatrice : Mme Kouadri Boujelthia N.

Encadreur : Mr. Bahri F.

Année universitaire 2020/2021.



REMERCIEMENT

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à Dieu le tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné la force et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude, ma reconnaissance et mes sincères remerciements à mon encadreur Mr. Bahri F, professeur à l'université de Mostaganem, faculté des sciences de la nature et de la vie, département de biologie.

D'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir aidée dans mes recherches.

Merci de m'avoir laissé la liberté nécessaire à l'accomplissement de mon travail, tout en y gardant un œil critique et avisé.

Votre rigueur scientifique, votre confiance ainsi que votre attention et disponibilité.

Merci pour votre soutien ainsi que vos précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce mémoire.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Madame Ait Chaabane L, maitre de conférences à l'université de Mostaganem, faculté des sciences de la nature et de la vie, département de biologie pour avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je tiens à remercier chaleureusement madame Kouadri Boudjelthia N, maitre-assistant à l'université de Mostaganem, faculté des sciences de la nature et de la vie, département de biologie pour avoir accepté d'examiner ce travail.



DÉDICACE

A mes très chers parents qui m'ont soutenu nuits et jours durant tout mon parcours, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon bien être. Que dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie

A mes deux chères sœurs (Asma et Nesrine) qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité, pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral. Que dieu vous protège, je vous aime

A Mon petit neveu (Anes) et ma petite nièce (Yousra) que dieu les garde pour moi

A Mes deux beaux-frères (Ahmed) et (Ilies) qui m'ont soutenu et encouragé

A la mémoire de mes grand parents puisse dieu tout puissant, assurer le repos de leurs âmes par sa sainte miséricorde

A ma chère grand-mère (hbiba) qui m'a accompagné par ses prières, puisse dieu lui prêter une longue vie et beaucoup de santé

A toute ma famille (oncles, tantes, cousins et cousines paternelles et maternelles)

Je le dédie à toutes les personnes qui me sont chère

Ce travail est le résultat de l'analyse de deux articles :

1. Maria C. Rota, Antonio Herrera, Rosa M. Martinez, Jose A. Sotomayor, Maria J. Jordan. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food Control 19 (2008) 681–687
2. Firas A. Al-Bayati. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. Journal of Ethnopharmacology 116 (2008) 403–406



 **ScienceDirect**
Available online at www.sciencedirect.com

**FOOD
CONTROL**

Food Control 19 (2008) 681–687 www.elsevier.com/locate/foodcont

Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*,
Thymus zygis and *Thymus hyemalis* essential oils

Mari´a C. Rota ^{a,*}, Antonio Herrera ^a, Rosa M. Marti´nez ^b, Jose A. Sotomayor ^b, Mari´a J. Jorda´n ^b

^a Department of Animal Production and Food Science, Food Hygiene, Inspection, Control and Microbiology Unit, Veterinary Faculty,

University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

^b Murcian Institute of Investigation and Agricultural Development (IMIDA), C./Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia), Spain

Received 2 November 2006; received in revised form 9 July 2007; accepted 13 July 2007

The present study describes the volatile profile and antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* (thymol chemotype), *Thymus zygis* subsp. *gracilis* (thymol and two linalool chemotypes) and *Thymus hyemalis* Lange (thymol, thymol/linalool and carvacrol chemotypes) essential oils extracted from seven plants cultivated in Murcia (Spain). Antimicrobial activities of the oils were evaluated for control of growth and survival of 10 pathogenic microorganisms.

Gas chromatography–mass spectrometry analysis allowed for the identification of between 42 and 51 compounds as main volatile constituents of each essential oil analyzed. Results presented here may suggest that the essential oils from *T. hyemalis* (thymol) followed by *T. hyemalis* (carvacrol), *T. zygis* (thymol) and *T. vulgaris* possesses antimicrobial properties, and are a potential source of antimicrobial ingredients for the food industry. 2007 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Essential oils; Antimicrobial activity; Foodborne pathogens; Aromatic plants

1. Introduction

The antimicrobial properties of plant volatile oils and their constituents from a wide variety of plants have been assessed (Lis-Balchin & Deans, 1997) and reviewed (Janssen, Scheffer, & Svendsen, 1987; Ríos, Recio, & Villar, 1987). It is clear from these studies that these secondary plant metabolites have potential uses in medical procedures and applications in the cosmetic, pharmaceutical and food industries (Baratta et al., 1998; Baratta, Dorman, & Deans, 1998; Iacobellis, Lo Cantore, Capasso, & Senatore, 2005; Lo Cantore, Iacobellis, De Marco, Capasso, & Senatore, 2004; Youdin, Dorman, & Deans, 1999). Biological activity of essential oils depends on their chemical composition

*

Corresponding author. Tel.: +34 976 761543; fax: +34 976 761590.

E-mail address: crota@unizar.es (M.C. Rota).

which is determined by the genotype and influenced by environmental and agronomic conditions (Marotti, Dellacecca, Piccaglia, & Giovanelli, 1992).

The genus *Thymus* has numerous species and varieties and their essential oil composition have been studied earlier (Guillen & Manzanos, 1998; Jorda'n, Mart'nez, Cases, & Sotomayor, 2003; Sotomayor, Mart'nez, Garc'ia, & Jorda'n, 2004). From *Thymus vulgaris* grown in France and in other countries (Piccaglia, Marotti, Giovanelli, Deans, & Eaglesham, 1993) six chemotypes has also been reported, geraniol, linalool, c(gamma)-terpineol, carvacrol, thymol and trans-thujan-4-ol/terpinen-4-ol; from *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, studies carried out by Morales (1986) and Sa'ez (1995b) about the essential oil variability of

this species growing wild in south eastern Spain, showed that the most common chemotype of this thyme was thymol, although a pure linalool chemotype was also recorded. The chemical variability of the essential oil from wild *T. hyemalis* of

Carramin'ana, Burillo, & Herrera, 2004), but unfortunately, there are few quantitative data (minimal inhibitory concentration or minimal bactericide concentration) related to the antimicrobial activity of essential oil obtained from different aromatic plants cultured in Murcia (Spain) against foodborne pathogens.

Therefore, this study was undertaken in order to investigate the effectiveness “in vitro” of *T. hyemalis*, *T.*

zygis and *T. vulgaris* essential oils on survival and growth of selected foodborne pathogens. These results will allow deduction of which components are likely to contribute to the antimicrobial activity according to GC characterization of essential oils and determination of any

-7135/\$ - see front matter 2007 Published by Elsevier Ltd.
doi:10.1016/j.foodcont.2007.07.007

the south eastern Iberian Peninsula has been reported also (Adzet, Granger, Passet, San Mart'ın, & Simo'n, 1976; Sa'ez, 1995a; Sotomayor, 1998). These researchers stated that thymol, carvacrol, borneol and linalool were the chemotypes most abundant in this area.

The antifungal and antibacterial activity exhibited by *Thymus* genus essential oil has been demonstrated by several researchers (Cruz et al., 1989; Karaman, Digrak, Ravid, & Iclim, 2001; Rasooli & Mirmostafa, 2003; Rota,

relationships between the components and their antibacterial activity.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Aromatic plants from different species of the genus *Thymus*, *Thymus vulgaris* (thymol chemotype); *Thymus zygis* subsp. *gracilis* (thymol chemotype; 39% linalool chemotype; 82% linalol chemotype) and *Thymus hyemalis* Lange (thymol chemotype; carvacrol chemotype; thymol/linalol chemotype), were obtained from an experimental crop of the Murcian Institute of Investigation and Agricultural Development (IMIDA) at Torreblanca (37°47'N – 054°0'W and 30 m above sea level) in the region of Murcia (Spain).

Aerial parts of dry individual plants were steam distilled for three hours using a Clevenger-type system (European Directorate for the Quality of Medicines, 1975). Essential oils were dried with anhydrous sodium sulfate and kept in amber vials at 4 °C until chromatographic analysis.

2.2. Gas chromatography

Samples of 0.1 mL were subjected to analysis by capillary gas chromatography. A Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph (GC) (Palo Alto, CA, USA), equipped with a flame ionization detector (FID) and a 30 m · 0.25 mm HP-5 (cross-linked Phenyl–Methyl Siloxane) column with 0.25 µm film thickness (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA), was used for this study. The FID and the injector were maintained at 280 °C and 250 °C, respectively. Helium was used as carrier gas, the flow through the column was 1 mL/min, and the split ratio was set to 100:1. The column was maintained at 60 °C for 4 min, increased to 64 °C at a rate of 1 °C/min, then increased to 155 °C at a rate of 2.5 °C/min and finally raised from 155 °C to 250 °C at a rate of 5 °C/min.

For the identification of the compounds, retention times and retention index were confirmed with commercially available standard compounds (Acros Organics BVBA/

SPRL, Fisher Scientific S.A. and Sigma Aldrich Química S.A.).

2.3. Mass spectrometry analysis

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) was used for the identification of volatile components in thyme essential oil. For this portion of the work, a Hewlett-Packard 5890 Series II Plus gas chromatograph (GC),

equipped with a 30 m · 0.25 mm HP-5 column with 0.25 µm film thickness, was used. The GC was linked to a Hewlett-Packard Model 5972 mass spectrometry detector. The chromatographic conditions were identical to those used for gas chromatography analysis.

2.4. Qualitative and quantitative analysis

The individual peaks were identified by retention times and retention index (relative to C₆–C₁₇ n-alkanes), compared with those of known compounds, and by comparison of mass spectra using the NBS75K library (United States, National Bureau of Standards, 1986) and spectra obtained from the standard, except for tricyclene, α-thujene, verbenene, (Z)-sabinene hydrate, (E)-verbenol, and pinocarvone, which were tentatively identified considering the NBS75K library spectra and their corresponding retention index. Percentage compositions of samples were calculated according to the area of the chromatographic peaks.

Samples were analyzed according to a previously developed methodology (Jordan et al., 2003; Sotomayor et al., 2004).

2.5. Antimicrobial assay (disk diffusion assay)

The essential oils were screened for antimicrobial activity using the agar diffusion technique (Meena & Sethi, 1994; Rota et al., 2004) against 10 microorganisms of significant importance.

The bacterial strains were used to assess the antimicrobial properties of the test samples, seven Gram-negative strains: *Salmonella enteritidis* CECT 4155, *Salmonella typhimurium* CECT 443, *Escherichia coli* serovar O157:H7 CECT 4267, *Escherichia coli* CECT 516, *Yersinia enterocolitica* serotype O:8; biotype 1 CECT 4315, *Shigella flexneri* serovar 2a CECT 585 and *Shigella sonnei* CECT 457 and three Gram-positive strains: *Listeria monocytogenes* serovar 4b CECT 935, *L. monocytogenes* serovar 1/2c CECT 911 and *Staphylococcus aureus* CECT 239. All strains were obtained from the Spanish Collection of Type Cultures and maintained in skimmed milk (Difco Laboratories, Detroit, MI) at 20 °C. Bacteria were grown in trypticase soy broth

enterocolitica; S. f.: *S. flexneri*; S. s.: *S. sonnei*; S. a.: *S. aureus*.

(Difco Laboratories, Detroit, MI) and incubated at 37 C (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. aureus*) or at 29 C (*Yersinia enterocolitica*).

Filter paper disks (Whatman No. 1, 6 mm diameter) containing 15 μ l of each essential oil were applied to the m-Table 1

Zones of growth inhibition (mm) showing antibacterial activity for a number of selected plant volatile oils; disk diameter 6.0 mm

Oils	Strains tested									
	S. e.	S. t.	E. c-1	E. c-2	L. m-1	L. m-2	Y. e.	S. f.	S. s.	S. a.
Thymus zygis										
Thymol ch	32.2	30.3	20.3	16.0	36.6	44.0	46.6	36.0	30.0	25.0
39% Linalool ch	13.0	28.3	16.6	8.0	16.6	11.0	27.6	22.6	18.6	18.3
82% Linalool ch	10.0	30.3	15.0	11.6	12.0	13.3	35.0	32.6	21.3	18.6
Thymus vulgaris										
Thymol ch	32.0	36.0	19.6	28.3	43.0	35.0	31.3	29.6	29.6	45.0
Thymus hyemalis										
Carvacrol ch	17.0	22.0	15.0	17.6	21.6	19.6	28.6	20.0	17.6	35.0
Thymol/linalool ch	15.0	20.3	12.6	15.0	18.3	25.0	37.0	21.0	16.0	32.3
Thymol ch	26.0	26.0	21.6	18.6	29.3	25.0	31.3	29.0	28.0	38.6

S. e.: *S. enteritidis*; S. t.: *S. typhimurium*; E. c-1: *E. coli* O157:H7; E. c-2: *E. coli*; L. m-1: *L. monocytogenes* (4b); L. 2: *L. monocytogenes* (1/2c); Y. e.: *Y.*

surface of agar plates that were previously seeded by spreading of 0.1 ml overnight culture. The plates were incubated overnight at the appropriate temperature (see above), and the diameter of the resulting zone of inhibition was measured in millimetres. The results indicated in Table 1 and in the text represent the net zone of inhibition including the diameter (6 mm) of the paper disk. The scale of measurement was the following (disk diameter included): P20 mm zone of inhibition is strongly inhibitory; <20– 12 mm zone of inhibition is moderately/mildly inhibitory; and <12 mm is no inhibitory.

All the data collected for each assay are the averages of three determinations.

2.6. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericide concentration (MBC)

The essential oils that previously showed antimicrobial activity (P12 mm zone of inhibition) were screened for determination of MIC and MBC by the tube dilution method against the same microorganisms (Rota et al., 2004). Well-isolated, single bacterial colonies from

overnight plates were transferred into trypticase soy broth. The appropriate amount of the essential oil dissolved in 95% ethanol was added to trypticase soy broth. Triplicate serial dilutions were prepared from this broth and were then inoculated with bacteria to a final concentration of 10^6 cells/mL. The highest

concentration tested was 9% (vol/vol), although for some this was 15% (vol/vol). The lowest concentration tested was 0.1% (vol/vol). The growth of each culture was monitored by plating suitable diluted aliquots of the culture (viable counts) on trypticase soy agar at specific time intervals. In each case control broths containing 3% (vol/vol) solvent (95% ethanol) were also prepared. After overnight incubation at the appropriate temperature, the MIC was read. MIC was calculated.

The MIC was the lowest concentration at which bacteria failed to grow in TSB, but bacterial growth was observed after transferring 100 μ l to TSA. Similarly, the MBC was the lowest concentration at which bacteria failed to grow in TSB and the subsequent transfer to TSA (Janssen et al., 1987). The evaluation of MIC and MBC was carried out in triplicate.

3. Results and discussion

3.1. Antimicrobial activity (assay disk)

Preliminary screening of the antimicrobial activity in vitro of the seven essential oils from three *Thymus*

Strains tested

	<u>Y. e.</u>		<u>S. f.</u>		<u>S. s.</u>		<u>S. a.</u>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Thymus zygis								
Thymol ch	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	0.5	0.5	<0.2	0.5
39% Linalool ch	<0.2	0.5	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
82% Linalool ch	0.5	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2	1.2
Thymus vulgaris								
Thymol ch	<0.2	0.5	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
Thymus hyemalis								
Carvacrol ch	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
Thymol/linalool ch	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7
Thymol ch	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2

S. e.: *S. enteritidis*; S. t.: *S. typhimurium*; E. c-1: *E. coli* O157:H7; E. c-2: *E. coli*; L. m-1: *L. monocytogenes*(4b); L. m-2: *L. monocytogenes*(1/2c); Y.e.: *Y. enterocolitica*; S. f.: *S. flexneri*; S. s.:*S. sonnei*; S. a.: *S. aureus*; NT: no tested.

Table 2

Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericide concentration (MBC) (1l/mL) of selected plant volatile oils

Oils	Strains tested											
	<u>S. e.</u>		<u>S. t.</u>		<u>E. c-1</u>		<u>E. c-2</u>		<u>L. m-1</u>		<u>L. m-2</u>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Thymus zygis												
Thymol ch	<0.2	1.2	<0.2	<0.2	0.5	0.5	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
39% linalool ch	<0.5	1.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	NT	NT	<0.5	1.0	NT	NT
species was studied against 10 pathogens microorganisms using the filter paper disc agar diffusion technique. The results showed variation in the antimicrobial properties of plant essential oils (Table 1). The essential oils showed strong activity (inhibition zone P20 mm), moderate activity (inhibition zone <20–12 mm) and no inhibition (zone <12 mm). Attending to this, the major effectiveness was achieved by the essential oils from T. hyemalis (thymol chemotype) followed by T. zygis (thymol chemotype) and T. vulgaris. Related to the inhibition of growth no differences were detected among these cited essential oils, since all of them showed a strong activity for nine of the ten strains assayed.	Thymol ch <0.2											
Thymus hyemalis												
Carvacrol ch	5.0											
Thymol/linalool ch	<0.2											
Thymol ch	<0.2	NT	<0.2	<0.2	<0.2	1.5	1.5	NT	NT	<0.5	<0.5	<0.5
82% Linalool ch	NT											
Thymus vulgaris												
However, more precise data on the antimicrobial properties were obtained through the determination of bacteriostatic and bactericidal concentrations. The minimum inhibitory concentration (MIC; 1l oil/mL medium) and minimum bactericidal concentration (MBC; 1l oil/mL medium) (against 10 microorganisms) of seven essential oils obtained from 3 Thymus species are shown in Table 2. The essential oils with the most bactericidal and bacteriostatic properties were: T.	1.2 <0.2 <0.2 0.5 0.5 0.5 0.5 <0.2 <0.2 <0.2 <0.2											
	5.0 <0.2 <0.2 <0.2 <0.2 <0.2 <0.2 <0.2 <0.2 <0.2 <0.2 <0.2											
	2.0 0.2 0.2 1.5 1.5 2.0 2.0 <0.5 <0.5 <0.2 <0.2											
	<0.2 <0.2 <0.2 <0.2 <0.2 <0.2 <0.2 0.5 0.5 <0.2 <0.2											
	hyemalis (thymol and carvacrol chemotypes), T. zygis (thymol ch.) and T. vulgaris											
	(thymol ch.) with MIC 60.2 1l/mL against 9, 8 and 8 strains tested, and MBC 60.2 1l/mL against 9, 6 and 6 strains assayed, respectively.											
	Qualitative and quantitative analysis of the essential oils volatile profile are listed in Table 3. These results showed that there are many qualitative similarities between the oils although the amounts of some											

corresponding compounds are different. In *T. vulgaris* (thymol ch.) oil, 47 components were identified, which represented about 96.1% of the total detected constituents. The major constituents of the oil were thymol (57.7%), p-cymene (18.7%) and carvacrol (2.8%). Other components were present in amounts less than 2%. In particular phenols were the most abundant compound group of the oil (61.8%). In the oil of *T. zygis* subsp. *gracilis*, (thymol ch.) 43 compounds, constituting 97.1% of the oil, were identified. Thymol (68.1%) was the major component, followed by p-cymene (11.2%), c-terpinene (4.8%) and carvacrol (3.5%). Similar composition was quantified for *T. vulgaris*, since phenols were also the most abundant compound group of the oil (71.6%). However, alcohols were the major group quantified in the other two chemotypes (linalool chemotypes) of *T. zygis* (71.4 and 84.5%), respectively.

In *T. hyemalis* oil (thymol, thymol/linalool and carvacrol chemotypes) 49, 51 and 51 components were identified representing about 97%, 98.4% and 86.7% of the total detected constituents. Major components quantified for the thymol chemotype were: thymol (43%) followed by p-cymene (16.0%) and c-terpinene (8.4%); for *T. hyemalis* thymol/linalool chemotype: linalool (16.6%), thymol (16.0%), c-terpinene (9.8%), 1-8-cineole (5.4%), borneol (4.7%), verbenone (4.8%); and for *T. hyemalis* carvacrol chemotype were: carvacrol (40.1%), p-cymene (19.8%), borneol (5.0%) and thymol (2.9%).

After this, the goal of the present work was to evaluate how the bacteriostatic and bactericidal effectiveness of the thyme essential oils assayed was affected by the relative concentration of their major volatile compounds.

In our study, most of the antimicrobial activity in essential oils from *Thymus* genus appears to be associated with phenolic compounds (thymol and carvacrol), these results agree with those reported by other authors (Consentino et al., 1999; Davidson & Naidu, 2000; Skocibusic, Bezic, & Dunkic, 2006). In this way, and relative to the oils in which thymol is the component which define the chemotype, it is interesting to remark that, for some of the microorganisms assayed, an elevated concentration in this components does not necessary lead to the best bacteriostatic and bactericidal effectiveness of the thyme essential oils. Thus, analyzing the results shown in Tables 1 and 2,

Table 3

Chemical composition of *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, *Thymus vulgaris* and *Thymus hyemalis* Lange

Components	<u>T. zygis</u>			<u>T. vulgaris</u>	<u>T. hyemalis</u>		
	Ch. linalool	Ch. linalool	Ch. thymol	Ch. thymol	Ch. thymol	Ch. thymol/linalool	Ch. carvacrol
Hydrocarbons	(%) Relative concentration						
Tricyclene	0.2	tr	tr	tr	tr	tr	tr
a(alpha)-Thujene	0.2	tr	0.7	0.8	1.0	0.8	0.1
a(alpha)-Pinene	1.2	3.6	0.3	0.8	1.4	2.7	1.3
Camphene	0.1	0.2	tr	0.4	0.4	1.2	1.7
Sabinene	2.0	tr	tr	tr	0.1	0.4	0.1
b(beta)-Pinene	0.2	0.1	0.1	0.3	0.2	0.5	0.3
Myrcene	5.2	0.4	1.5	1.5	0.9	1.4	0.9
a(alpha)-Phell and rene	tr	tr	0.2	tr	0.2	0.1	0.2
D(delta)-3-Carene	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
a(alpha)-Terpinene	3.1	0.2	1.0	0.6	1.3	1.1	1.2
p-Cymene	0.6	0.5	11.2	18.7	16.0	16.4	19.8
Limonene	2.5	0.5	0.4	0.5	1.1	1.6	0.7
(Z)-b(beta)-ocimene						0.2	tr
(E)-b(beta)-ocimene	tr	tr	tr	tr	tr	1.5	1.2
c(gamma)-Terpinene	5.1	0.4	4.8	1.9	8.4	9.8	tr
Terpinolene	1.5	1.0	tr	0.1	0.2	0.2	0.2
(E)-Caryophyllene	0.6	1.2	0.7	1.4	0.8	2.1	0.6
Aromadendrene			0.2		0.2	0.2	0.2
Alloaromadendrene			tr	tr	0.1	0.2	tr
Valencene	0.3	0.4	0.1		0.9	0.7	0.2
d(delta)-Cadinene			0.1	0.2	0.1	0.2	tr
Alcohols							
1-Octen-3-ol	0.2	tr	0.3	0.5	0.1	0.2	tr
(E)-Sabinene hydrate	18.2	0.2	0.8	0.9	0.5	0.4	0.4
(Z)-Sabinene hydrate			tr	0.1	0.2	0.1	0.1
Linalool	39.2	82.3	2.0	2.1	3.2	16.6	2.1
(E)-Pinocarveol					0.1	0.3	0.2
(Z)-Verbenol	tr	tr		tr	0.7	0.4	0.2
(E)-Verbenol	tr	tr		tr	tr	tr	0.3
Isoborneol	0.1	tr		tr			
Borneol	0.2	0.6	0.2	0.7	0.3	4.7	5.0
Terpinen-4-ol	11.0	0.2	0.4	0.6	0.7	0.4	0.6
p-Cymene-8-ol	tr	tr	tr	0.1	0.1	0.1	0.2
a(alpha)-Terpineol	2.3	0.2	tr	0.2	0.6	1.0	0.4
Geraniol	0.2	0.8	tr		0.6	tr	tr
Spathulenol	tr	0.2	0.2	tr	0.4	0.5	0.2
Aldehydes							

Myrtenal	0.2	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Decanal	0.2	tr	tr	tr	tr	0.0	tr
Geranial	0.3	0.2	0.0	tr	tr	0.1	tr
Ketones							
3-Octanone	tr	tr	0.1	tr	0.1	0.2	tr
Camphor	tr	tr		0.3	0.8	1.1	0.4
Pinocarvone					1.1	tr	tr
Dihydrocarbone	0.2	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.2
Verbenone				tr	3.9	4.8	1.3
Esters							
Benzyl acetate	0.1	0.2	tr	tr		tr	0.0
Bornyl acetate	tr	tr	tr	0.2	0.2	0.1	tr
Phenols							
Thymol methyl ether			tr	tr	3.0	tr	tr
Carvacrol methyl ether			tr	1.3	tr	1.2	0.9
Thymol	0.5	2.1	68.1	57.7	43.0	16.5	2.9
Carvacrol	tr	0.1	3.5	2.8	2.4	0.3	40.1
Epoxides							
(Z)-Linalool oxide	0.3	1.1		tr	tr	tr	tr
(E)-Limonene oxide	0.5	tr		tr			
Caryophyllene oxide	0.1	0.4	0.2	0.7	0.2	0.5	0.3

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Ether

1,8-Cineole tr 0.7 1.5 5.4 2.2 tr (<0.05%).

and compared to those from Table 3, in the case of *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7, essential oils from *T. zygis* (68% thymol) and *T. vulgaris* (58%) showed an elevated inhibition growth and similar MIC and MBC. However,

Components	T. zygis			T. vulgaris	T. hyemalis		
	Ch. linalool	Ch. linalool	Ch. thymol	Ch. thymol	Ch. thymol	Ch. thymol/linalool	Ch. carvacrol

these results were exceeded by those from T. hyemalis (43% thymol) essential oil, because MIC and MBC were determined under 0.2 l/mL.

Attending to the volatile profile of the essential oils, a richer relative concentration of terpenic hydrocarbons (terpinene), alcohols (linalool, (Z)-verbenol, terpinen-4-ol, α -(alpha)-terpineol, geraniol, spathulenol) ketones (camphor, verbenone) and thymol oxygenated derivatives (thymol methyl ether) were quantified in T. hyemalis (thymol ch.) when compared to T. zygis (thymol ch.) and T. vulgaris (thymol ch.). These results suggest that it could be a synergistic action among phenolic components and the above cited compounds. Similar results were observed for *S. somnei* and *S. aureus* bacteria, since T. vulgaris (58%) and T. hyemalis (43% thymol) showed better bactericidal behavior than T. zygis (68% thymol). Contrarily, higher relative concentrations of thymol are required to achieve the MBC for *L. monocytogenes* serovar 4b.

Carvacrol is another phenolic component that described the chemotype of T. hyemalis essential oil. The assays carried out using this essential oil (40% carvacrol) showed bactericidal and bacteriostatic activities similar to T. hyemalis (43% thymol) since concentrations under 0.2 l/mL were enough to achieve the MIC and MBC for 9 of the 10 microorganisms assayed. The bacteriostatic properties of this oil are suspected to be associated with the carvacrol content, which has been tested previously and was found to have a significant antibiotic activity (Consentino et al., 1999). Also, synergism between carvacrol and its precursor p-cymene has been noted. (Ultee, Bennink, & Moezelaar, 2002) showed that p-cymene is a very weak antibacterial, and swells bacterial cell membranes to a greater extent than carvacrol does. By this mechanism p-cymene probably enables carvacrol to be more easily transported into the cell so that a synergistic effect is achieved when the two are used together. Results obtained from the application of T. zygis subsp. gracilis (linalool chemotype) essential oils have demonstrated once again the synergist effect among volatile components in the essential oils. This means that a higher concentration in the major component does not necessarily suppose the best antimicrobial effects for most of the strains assayed. According to the results shown in Tables 1 and 2, a lower concentration of T. zygis (39% linalool) essential oil was required in order to achieve the MIC and MBC (60.2 l/mL) for *S. typhimurium*, *E. coli*

O157:H7, *S. flexneri*, *S. somnei*, *S. aureus*, and *Y. enterocolitica*. Contrarily, only T. zygis (82% linalool) essential oil had the most bactericidal and bacteriostatic effect (MIC and MBC 60.2 l/mL) against *S. typhimurium*, when compared to T. zygis (39% linalool) essential oil. These essential oils did not show any bactericidal activity against the strain *E. coli*. For this bacterium, the presence of thymol or carvacrol in the essential oil is important in order to show some kind of bacteriostatic and bactericidal effects.

(Pattnaik, Subramanyam, Bajaji, & Kole, 1997) found that linalool, as a main constituent of this oil, demonstrated strong inhibitory effect against 17 bacteria and 10 fungi. However, attending to the volatile profile of T. zygis (39% linalool) essential oils, a richer relative concentration of the terpenic hydrocarbons (α -(alpha) and c- terpinene, sabinene, myrcene, limonene), alcohols ((E)- sabinene hydrate, terpinen-4-ol and α -terpineol) were quantified when compared to T. zygis (82% linalool).

S. typhimurium, *Y. enterocolitica* and *S. flexneri* were the most susceptible organisms; their growth presented strong inhibition by all essential oils tested with MIC and MBC <0.2 l/mL, except T. zygis (82% linalool) and T. hyemalis (thymol/linalool ch.) with MIC and MBC <0.7 l/mL for *Y. enterocolitica* and *S. flexneri*. Our results indicate that *S. typhimurium* was more sensitive than *S. enteritidis*. These results were demonstrated in previous studies using 38 essential oils (Rota et al., 2004). However, in this same study, T. vulgaris essential oil had less activity against these same three pathogens with MIC (60.5 l/mL) and MBC (60.8 l/mL).

The growth of *L. monocytogenes* serovars 4b and 1/2c and *S. aureus* was inhibited by all essential oils tested, (strong and moderate inhibition) except *L. monocytogenes* serovar 1/2c that showed no inhibition by T. zygis (39% linalool). All essential oils assayed had low values for MIC and MBC (60.5 l/mL), except T. zygis (82% linalool) with MIC and MBC (61 l/mL) for *S. aureus*. The determination of bacteriostatic (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations is more sensitive than the agar disk diffusion technique, which can be used as a screening tool to eliminate those oils with no significant inhibitory properties against pathogens studied.

Among the seven essential oils tested to investigate the effectiveness “in vitro” on survival and growth of selected foodborne pathogens, the best results were obtained from those essential oils with richness and variety in volatile components, including precursors and final metabolites. Some studies have concluded that whole essential oils have a greater antibacterial activity than the major components mixed (Gill, Delaquis, Russo, & Holley, 2002), which suggest that minor components are critical to the activity and may have a synergistic effect or a potential influence on the essential oil.

These results confirm the potential use of thyme essential oils in food industry for the preservation of foodstuffs against bacteria and for increasing the shelf life of foodstuffs.

Acknowledgements

We thank the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), for providing the project SC00-052-C7-3, under which this work has been accomplished.

This research was funded by DGA/Grupo Consolidado de Investigación (Proyecto-A01).

References

- Adzet, T., Granger, R., Passet, J., San Martín, R., & Simón, M. (1976). *Chimiotypes de Thymus hyemalis* Lange. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 1, 6–15.
- Baratta, T. M., Dorman, D. H. J., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. C., & Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 235–244.
- Baratta, T. M., Dorman, D. H. J., & Deans, S. G. (1998). Chemical composition antimicrobial and antioxidative activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano, and Coriander essential oils. *Journal of Essential Oils Research*, 10, 618–627.
- Consentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian *Thymus* essential oils. *Letters of Applied Microbiology*, 29, 130–135.
- Cruz, T., Cabo, M. P., Cabo, M. M., Jiménez, J., Cabo, J., & Ruiz, C. (1989). In vitro antibacterial effect of the essential oil of *Thymus longiflorus* Boiss. *Microbios*, 60, 59–61.
- Davidson, P. M., & Naidu, A. S. (2000). Phyto-phenol. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* (pp. 265–294). Boca Raton, FL: CRC Press.
- European Directorate for the Quality of Medicines (1975). *European Pharmacopoeia*, European Council: Maisonneuve, France, Vol. 3, pp. 68–71.
- Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P., & Holley, R. A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 83–92.
- Guillen, M. D., & Manzanos, M. J. (1998). Study of the composition of the different parts of Spanish *Thymus vulgaris* L. plants. *Food Chemistry*, 63, 373–383.
- Iocabellis, N. S., Lo Cantore, P., Capasso, F., & Senatore, F. (2005). Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 57–61.
- Janssen, M. A., Scheffer, J. J. C., & Svendsen, A. B. (1987). Antimicrobial activities of essential oils: A 1976–86 literature review on possible applications. *Pharmaceutische Weekblad (Scientific Edition)*, 9, 193–197.
- Jordán, M. J., Martín, R. M., Cases, M. A., & Sotomayor, J. A. (2003). Watering level effect on *Thymus hyemalis* Lange essential oil yield and composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5420–5427.
- Karaman, S., Digrak, M., Ravid, V., & Iclim, A. (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(2), 183–186.

- Lis-Balchin, M., & Deans, S. G. (1997). Bioactivity of selected plant against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 759–762.
- Lo Cantore, P., Iacobellis, N. S., De Marco, A., Capasso, F., & Senatore, F. (2004). Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Millar Var. *Vulgare* (Millar) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 862–866.
- Marotti, M., Dellacecca, V., Piccaglia, R., & Giovanelli, E. (1992). Agronomic and chemical evaluation of three varieties of *Foeniculum vulgare* Mill. Presented at First World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare. Maastricht, The Netherlands, pp. 19–25.
- Meena, M. R., & Sethi, V. (1994). Antimicrobial activity of essential oils from spices. *Journal of Food Science and Technology*, 31, 68–70.
- Morales, R. (1986). Taxonomía del género *Thymus* L. Excluída la Sect. *Serpyllum* (Miller) Benth en la Península Ibérica. *Ruiza 3*. C.S.I.C., Madrid.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M., & Kole, C. R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89, 39–46.
- Piccaglia, R., Marotti, M., Giovanelli, E., Deans, S. G., & Eaglesham, E. (1993). Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 2, 7–50.
- Rasooli, I., & Mirmostafa, S. A. (2003). Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2200–2205.
- Ríos, J. L., Recio, M. C., & Villar, A. (1987). Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. *Journal of Ethnopharmacology*, 21, 139–152.
- Rota, C., Carraminãna, J. J., Burillo, J., & Herrera, A. (2004). In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67, 1252–1256.
- Saéz, F. (1995a). Essential oil variability of *Thymus hyemalis* growing wild in Southeastern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23, 431–438.
- Saéz, F. (1995b). Essential oil variability of *Thymus zygis* growing wild in Southeastern Spain. *Phytochemistry*, 40, 819–825.
- Skocibusic, M., Bezic, N., & Dunkic, V. (2006). Phytochemical composition and antimicrobial activities of essential oils from *Satureja subspicata* Vis. Growing in Croatia. *Food Chemistry*, 96, 20–28.
- Sotomayor, J. A. (1998). Estudio sobre plantas aromáticas de los géneros *Salvia* y *Thymus*, espontáneas en el Sureste Ibérico, para su establecimiento como cultivo. Doctoral Thesis. University of Murcia, Departamento de Biología Vegetal (Botánica), Murcia (Spain).
- Sotomayor, J. A., Martínez, R. M., García, A. J., & Jordán, M. J. (2004). *Thymus zygis* subsp. *gracilis*: watering level effect on phytomass production and essential oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5418–5424.
- Ultee, A., Bennink, M. H., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogens *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 1561–1568.
- Youdin, K. A., Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (1999). The antioxidant effectiveness of thyme oil, α -tocopherol and ascorbyl palmitate on evening primrose oil oxidation. *Journal of Essential Oils Research*, 11, 643–648.



Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts

Firas A. Al-Bayati*

Department of Biology, College of Education, University of Mosul, Mosul, Iraq

Received 17 June 2007; received in revised form 28 October 2007; accepted 5 December 2007

Available online 14 December 2007

Abstract

Essential oils (EOs) and methanol extracts obtained from aerial parts of *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* seeds were evaluated for their single and combined antibacterial activities against nine Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichiacoli*, *Proteusvulgaris*, *Proteusmirabilis*, *Salmonellatyphi*, *Salmonellatyphimurium*, *Klebsiellapneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The essential oils and methanol extracts revealed promising antibacterial activities against most pathogens using broth microdilution method. Maximum activity of *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts (MIC 15.6 and 62.5g/ml) were observed against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Proteus vulgaris*. Combinations of essential oils and methanol extracts showed an additive action against most tested pathogens especially

Pseudomonas aeruginosa. © 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Synergistic antibacterial activity; Essential oils; Methanol extract; *Thymus vulgaris*; *Pimpinella anisum*

1. Introduction

Essential oils (EOs) also called volatile or ethereal oils are aromatic oily liquids obtained from different plant parts and

widely used as food flavours (Burt, 2004). Volatile oils have been shown to possess antibacterial, antifungal, antiviral, insecticidal and antioxidant properties (Kordali et al., 2005). Some oils have been used in cancer treatment (Sylvestre et al., 2006), while others have been used in food preservation (Faid et al., 1995), aromatherapy (Buttner et al., 1996) and fragrance industries (Van de Braak and Leijten, 1999). There has been an increased interest in looking at antimicrobial properties of extracts from aromatic plants particularly essential oils (Milhau et al., 1997).

Phytomedicines derived from plants have shown great promise in the treatment of intractable infectious diseases including viral infections (Cowan, 1999).

Single and poly herbal preparations have been used numerously throughout history for the treatment of various diseases. Many studies have been carried out to extract various natural products for screening antimicro-

* Tel.: +964 770 303 34 14.

E-mail address: firmas.bayati@gmail.com.

0378-8741/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.jep.2007.12.003

bial activity but attention has not been focused intensively on studying the combinations of these products for their antimicrobial activity (Abu-Shanab et al., 2004).

Thymus vulgaris L. (Thyme), locally known “zaatar” member of the Lamiaceae family, is widely used in Iraqi folk

medicine for its expectorant, antitussive, antibronchitic, antispasmodic, anthelmintic, carminative and diuretic properties. Iranian and Turkish *Thymus* species have been, respectively, reported for their antibacterial (Rasooli and

Mirmostafa, 2002) and antimicrobial activities (Tepe et al., 2004).

Pimpinella anisum L. (Anise), member of Umbelliferae family, is an annual herb with white flowers and small green to yellow seeds, which grows in Iraq, Turkey, Iran, India, Egypt and many other warm regions of the world (Pourgholami et al., 1999). Members of this genus are cultivated for their aromatic seeds used in medicine as a condiment, mild expectorant and also in treating dyspeptic complaints (Fujimatu et al., 2003). In addition, essential oils of some Iraqi *Pimpinella* species have been used to treat some diseases like seizures and epilepsy.

Due to the combination uses of these two plants in Iraqi folk medicine (Majeed and Mahmood, 1988), this study

aimed to

404 F.A. Al-Bayati / Journal of Ethnopharmacology 116 (2008) 403–406

effects of these plants against some widely spread pathogens.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials

Aerial parts of *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* seeds were purchased from the local market in Mosul city, Nineveh province, Republic of Iraq and identified at Department of Biology, College of Education, University

of Mosul. Voucher specimen of the plants (No. 103, 104, respectively) were dried and deposited at the herbarium of Biology Department, University of Mosul.

2.2. Essential oil extraction

2.4. Test organisms

All microorganisms were obtained from Department of Biology, College of Science, University of Mosul, Iraq. Seven strains of Gram-negative bacteria: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and two strains of Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were used. The cultures of bacteria were maintained in their appropriate agar slants at 4°C throughout the study and used as stock cultures.

2.5. Antibacterial activity assay

The aniseeds and dried flowering parts of thyme were submitted to steam distillation in a Clevenger type apparatus for 3 h. The essential oils obtained were separated from water and dried over anhydrous Na₂SO₄ then stored at 4°C until use (yields 2.07% from aniseeds and 1.67% from thyme aerial parts).

2.3. Methanol extracts

Powdered samples 100g from each plant part were extracted with methanol (MeOH) using a soxhlet extractor for 10h continuously or until the used solvent turned pure and colourless (Chhabra et al., 1982). The solvent was removed using a rotary vacuum evaporator at 40°C to give concentrated extracts, which were frozen and freeze-dried until use.

Antibacterial activity was determined based on a microwell dilution method (Swanson et al., 1992). Bacterial strains were cultured overnight at 37°C on Mueller Hinton broth and adjusted to a final density of 10^6 cfu/ml, and used as an inoculum. The essential oils and methanol extracts of each plant were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then in Mueller

Hinton broth to reach a final concentration of 500.0g/ml. Serial twofold dilutions were made in a concentration range from 7.8 to 500.0g/ml in sterile test tubes containing Mueller Hinton broth. The 96-well plates were prepared by dispensing into each well 95l of Mueller Hinton broth and 5l of the bacterial inoculum. A 100l (50l+50l in case of combination) from each plant essential oil and methanol extract initially prepared

inhibited, the solution in the well remained clear after oils

was added into the first wells. Then, 100l from their serial dilutions was transferred into six consecutive wells. The last well containing 195l of Mueller Hinton broth without compound and 5l of the inoculum on each strip was used as negative control. The final volume in each well was 200l. Maxipime (Bioanalyse) at the concentration range of 500.0–7.8g/ml was prepared in Mueller Hinton broth and used as standard drug for positive control. Contents of each well were mixed on a plate shaker at 300rpm for 20s prior to incubation at 37°C for 24h. Each experiment was tested in triplicate. As an indicator of bacterial growth, 40l *p*-iodonitrotetrazolium violet (INT) dissolved in water were added to the wells and incubated at 37°C for 30min (Buwa and van Staden, 2006). The lowest concentration of each extract showing no growth was taken as its minimal inhibitory concentration (MIC) and confirmed by plating 5l samples from clear wells on Mueller Hinton agar medium. The colourless tetrazolium salt acts as an electron acceptor and is reduced to a red-coloured formazan product by biologically active organisms (Eloff, 1998). Where bacterial growth was

Combinations between the two essential

incubation with INT.

3. Results

The antibacterial activities of *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts were assayed in vitro by a broth micro-dilution method against nine pathogenic bacteria. Table 1 summarizes the microbial growth inhibition by each plant essential oil and their combination effects.

According to the results, thyme essential oil was found to be active against all pathogenic bacteria except *Pseudomonas aeruginosa*. The strongest antibacterial activity was seen against *Bacillus cereus* with a MIC value of 15.6g/ml followed by *Staphylococcus aureus* and *Proteus vulgaris* MIC 31.2g/ml. While *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* resisted *Pimpinella anisum* essential oil and the best MIC value 62.5g/ml was against *Bacillus cereus* and *Proteus vulgaris*.

possessed high inhibitory activities against most pathogenic bacteria compared with the standard antibiotic Maxipime which was resisted by *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. The strongest combination effect was seen against *Proteus vulgaris* with a MIC value of 15.6g/ml, in addition *Pseudomonas aeruginosa* was inhibited using the largest concentration of the combined essential oils.

Staphylococcus aureus showed best susceptibility towards the methanol extract of *Thymus vulgaris* with a MIC value of 15.6g/ml (Table 2) followed by *Bacillus cereus* and *Proteus vulgaris* MIC 31.2g/ml. On the other hand, the methanol extract of *Pimpinella anisum* demonstrated moderate activities against tested bacteria. The best activity was seen against *Staphylococcus aureus* and the lowest activity was against *Salmonella typhimurium* MIC 62.5 and 500.0g/ml, respectively, while *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* resisted all the methanol extract concentrations of the two plants. Co

F.A. Al-Bayati / Journal of Ethnopharmacology 116 (2008) 403–406 405

Table 1
Single and combined antibacterial activity of *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils

Microorganisms	Gram +/-	MIC values (g/ml)		
		<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Pimpinella anisum</i>	Essential oils Combined EOs Maxipime
<i>Pseudomonas</i>	G	>500.0	>500.0	500.0 >500.0
<i>aeruginosa</i>				

<i>Staphylococcus aureus</i>	G+	31.2	125.0	62.5	7.8
<i>Bacillus cereus</i>	G+	15.6	62.5	62.5	>500.0
<i>Escherichia coli</i>	G-	62.5	>500.0	250.0	15.6
<i>Proteus vulgaris</i>	G-	31.2	62.5	15.6	62.5
<i>Proteus mirabilis</i>	G- G	62.5	125.0	31.2	62.5
<i>Salmonella typhi</i>	- G	250.0	500.0	125.0	>500.0
<i>Salmonella typhimurium</i>		125.0	250.0	62.5	>500.0

Klebsiella pneumoniae G 500.0 >500.0 250.0 31.2

nations of the methanol extracts showed positive results against most tested bacteria, especially against *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The largest effect was observed against *Proteus vulgaris* MIC 15.6g/ml.

4. Discussion

Plant essential oils and extracts have been used for many thousands of years (Jones, 1996), especially in food preservation, pharmaceuticals, alternative medicine and natural therapies (Lis-Balchin and Deans, 1997). It has long been acknowledged that some plant essential oils exhibit antimicrobial properties (Finnemore, 1926) and it is necessary to investigate those plants scientifically, which have been used, in traditional medicine to improve the quality of healthcare. Essential oils are potential sources of novel antimicrobial compounds especially against bacterial pathogens (Prabuseenivasan et al., 2006).

In this paper, the essential oils and methanol extracts of *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* inhibited bacterial growth but their effectiveness varied. MIC values showed by the essential oils and the methanol extracts (single and combined) were in the range of 15.6–500.0g/ml and 7.8–62.5g/ml regarding the standard drug Maxipime (Tables 1 and 2).

The Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were more sensitive to the essential oils than the Gram-negative bacterium except *Proteus vulgaris*. It has

bacteria (Mann et al., 2000). The tolerance of Gram-negative bacteria to essential oils has been ascribed to the presence of a hydrophilic outer membrane that blocks the penetration of hydrophobic essential oils into target cell membrane.

The antibacterial activities of *Thymus vulgaris* essential oil and methanol extract could be associated to the presence of phenolic compounds like carvacrol, thymol, -terpinene and p-cymene, which are all reported to have antibacterial properties (McGimpsey et al., 1994; Cosentino et al., 1999; Juliano et al., 2000). While chemical studies have demonstrated that *Pimpinella anisum* seeds contain anethole, estragole, eugenol, coumarins and terpene hydrocarbons (Monod and Dortan, 1950 ; Chandler and Hawkes, 1984; Burkhardt et al., 1986) which are good antibacterial compounds (Cowan, 1999).

The MIC values indicated that the essential oil of *Thymus vulgaris* was more efficient than that of *Pimpinella anisum*.

Recent studies have shown that essential oils of oregano (*Origanum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*), bay (*Pimenta racemosa*) and clove (*Eugenia caryophyllata* synonym: *Syzygium aromaticum*) were found to be strongly antimicrobial among the many tested (Smith Palmer et al., 1998; Hammer et al., 1999; Dorman and Deans, 2000).

Some significant infections should not be treated with single antibiotic, due to that bacteria can rapidly

frequently been reported that Gram-positive bacteria are more susceptible to essential oils than Gram-negative

develop resistance

Microorganisms	Gram +/-	MIC values (g/ml)			
		Methanol extract		Combined methanol extracts	Maxipime
		<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Pimpinella anisum</i>		

Table 2

Single and combined antibacterial activity of methanol extracts from *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum*

<i>Staphylococcus aureus</i>	G+	15.6	62.5	31.2	7.8
<i>Bacillus cereus</i>	G+	31.2	125.0	62.5	>500.0

Escherichia coli G 250.0 >500.0 125.0 15.6 *Proteus vulgaris* G 31.2 125.0 15.6 62.5 *Proteus mirabilis* G 62.5

	—											
	—											
	—											
125.0	62.5	62.5	<i>Salmonella typhi</i> G	62.5	250.0	125.0	>500.0	<i>Salmonella typhimurium</i> G	250.0	500.0	125.0	>500.0
				—								
				—								
				—								
				—								
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G	>500.0		>500.0	250.0		31.2					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G	>500.0		>500.0	500.0		>500.0					

when such a single antibiotic is used. According to different reports, multiple drug resistances to *Pseudomonas aeruginosa* are spreading in the world and making the therapeutic management of these patients more problematic (Obritsch et al., 2005).

Many phytomedicines exert their beneficial effects through the additive or synergistic action of several chemical compounds acting at single or multiple target sites (Adwan et al., 2006). In the present study, the data showed that the combination effects of these plants had antibacterial enhancement (additive effects) against most pathogenic bacteria especially *Pseudomonas aeruginosa* which resisted all single actions of essential oils, methanol extracts and the standard drug.

References

- Abu-Shanab, B., Adwan, G., Abu-Safiya, D., 2004. Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in Palestine. *Turk Journal of Biology* 28, 99–102.
- Adwan, G., Abu-Shanab, B., Adwan, K., Abu-Shanab, F., 2006. Antibacterial effects of nutraceutical plants growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Turk Journal of Biology* 30, 239–242.
- Burkhardt, G., Reichling, J., Martin, R., Becker, H., 1986. Terpenhydrocarbons in *Pimpinella anisum*. *Pharmacy Weekly Science* 8, 190–193.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253.
- Buttner, M.P., Willeke, K., Grinshpun, S.A., 1996. Sampling and analysis of airborne microorganisms. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V. (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C, pp. 629–640.
- Buwa, L.V., van Staden, J., 2006. Antibacterial and antifungal activity of traditional medicinal plants used against venereal diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 139–142.
- Chandler, R.F., Hawkes, D., 1984. Aniseed: spice, flavour, drug. *Journal of Canadian Pharmacology* 117, 28–29.
- Chhabra, S.C., Shao, J.F., Mshiu, E.N., 1982. Antifungal activity among traditionally used herbs in Tanzania. *The Dar Medicinal Journal* 9, 68–73.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F., 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29, 130–135.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 564–582.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308–316.
- Eloff, J.N., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64, 711–713.
- Faid, M., Bakhy, K., Anchad, M., Tantaoui-Elaraki, A., Alomondpaste, 1995. Physicochemical and microbiological characterizations and preservation with sorbic acid and cinnamon. *Journal of Food Products* 58, 547–550.
- Finnemore, H., 1926. *The Essential Oils*. Ernest Benn Limited, London.
- Fujimatu, E., Ishikawa, T., Kitajima, J., 2003. Aromatic compound glucosides, alkyl glucoside and glucide from the fruit of anise. *Phytochemistry* 63, 609–616.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86, 985–990.
- Jones, F.A., 1996. Herbs—useful plants. Their role in history and today. *European Journal of Gastroenterology Hepatol* 8, 1227–1231.

- Juliano, C., Mattana, A., Usai, M., 2000. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12, 516–522.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A., 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9452–9458.
- Lis-Balchin, M., Deans, S.G., 1997. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 82, 759–762.
- Majeed, S.H., Mahmood, M.J., 1988. *Herbs and Medicinal Plants in Iraq Between Traditional Medicine and Scientific Research*, first ed. Dar AlThaowra for Publishing, Baghdad, p. 67 (in Arabic).
- Mann, C.M., Cox, S.D., Markham, J.L., 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology* 30, 294–297.
- McGimpsey, J.A., Douglas, M.H., Van Klink, J.L., Beaugard, D.A., Perry, N.B., 1994. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour and Fragrance Journal* 9, 347–352.
- Milhau, G., Valentin, A., Benoit, F., Mallie, M., Bastide, J., Pelissier, Y., Bessiere, J., 1997. In vitro antimicrobial activity of eight essential oils. *Journal of Essential Oil Research* 9, 329–333.
- Monod, C., Dortan, D., 1950. Eugenol in anise oil. *Chemical Abstracts* 45, 3124.
- Obritsch, M.D., Fish, D.N., MacLaren, R., 2005. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy* 10, 1353–1364.
- Pourgholami, M.H., Majzoob, S., Javadi, M., Kamalinejad, M., Fanaee, G.H.R., Sayyah, M., 1999. The seeds essential oil of *Pimpinella anisum* exerts anticonvulsant effects in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 211–215.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6, 39.
- Rasooli, I., Mirmostafa, S.A., 2002. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia* 73, 244–250.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology* 26, 118–122.
- Swanson, K.M.S., Busta, F.F., Peterson, E.H., Johanson, M.G., 1992. Colony count methods. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Food*, third ed. American Public Health Association, Washington, pp. 75–95.
- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Nagau, F., Legault, J., 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 99–102.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, M., Polissiou, M., Sokmen, A., 2004. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii* M. Zohary et P.H. Davis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1132–1137.
- Van de Braak, S., Leijten, G., 1999. *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and Other Major Markets in the European Union*. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.

ملخص

الزعتالمظهر الجانبي المتطاير والنشاط المضاد للميكروبات لـ الدراسة هذتهتصف . ر
من منطقة العراق المأخوذة الزعتر الميثانول المأخوذ من الأجزاء الهوائية من بذور ومستخلص الأساسية الزيوت تم تقييم
ريا موجبة الجرام وسالبة لأنشطتها المضادة للبكتيريا ضد تسعة أنواع من البكتي: الجرام
Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis,
Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Klebsiella pneumoniae et Pseudomonas
aeruginosa.

ومستخلصات الميثانول انشطة واعدة مضادة لاطهرت الزيوت . لجراثيم ضد معظم مسببات الامراض
ومستخلص الميثانول الحد الأدنى للتركيز لوحظ اقصى نشاط للزيوت الأساسية من 6..1 و 1... مل ضد /الاساسية جم
Staphylococcus aureus و Bacillus cereus و Proteus vulgaris الزعتر

تم الحصول عليها من منطقة مورسيا تم تقييمها للتحكم في التي الزعتر الأنشطة المضادة للميكروبات للزيت العطري من
النمو وبقاء 61 قد تشير النتائج . لزعترل ي ساسج المقدمة هنا إلى أن الزيت الامن الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض
يمتلك خصائص مضادة للميكروبات وهو مصدر محتمل للمكونات المضادة للميكروبات لصناعة الأغذية .
لهما تأثير قوي مضاد للميكروباتالاساسي أظهرت النتائج أن مستخلص الزعتر بالإضافة إلى الزيت
الأساسيةالكلمات :نشاط مضاد للجراثيم للميكروبات،نشاط مضاد أساسي،زيت ،الزعتر .

Résumé

La présente étude décrit le profil volatil et l'activité antimicrobienne de *t. vulgaris*.

L'HE et l'extrait de méthanol obtenus à partir des parties aériennes de graines de *T.vulgaris* obtenue de la région d'Iraq ont été évalués pour leurs activités antibactériennes contre neuf bactéries pathogènes Gram-positives et Gram-négatives : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les HEs et les extraits de méthanol ont révélé des activités antibactériennes prometteuses contre la plupart des agents pathogènes en utilisant la méthode de micro dilution en bouillon. L'activité maximale des huiles essentielles de *T. vulgaris* et de l'extrait de méthanol (CMI 15,6 et 62,5 g/ml) a été observé contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Proteus vulgaris*.

Les activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de *t. vulgaris* obtenue de la région de Murcie ont été évaluées pour le contrôle de croissance et la survie de 10 micro-organismes pathogènes. Les résultats présentés ici peuvent suggérer que l'huile essentielle de *T. vulgaris* possède des propriétés antimicrobiennes et sont une source potentielle d'antimicrobiens ingrédients pour l'industrie alimentaire.

Les résultats montrent que l'extrait de Thym ainsi que son huile essentielle sont fortement antimicrobiens et possèdent une forte activité antibactérienne.

Mots clés : *Thymus vulgaris* L., huile essentielle, activité antimicrobienne, activité antibactérienne

Abstract

The present study describes the volatile profile and antimicrobial activity of *t. vulgaris*. Essential oil and methanol extract obtained from aerial parts of *T. vulgaris* seeds obtained from the region of Iraq were evaluated for their antibacterial activities against nine Gram-positive

and Gram-negative pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Essential oils and methanol extracts have shown promising antibacterial activities against most pathogens using the micro-dilution method in broth. The maximum activity of *T. vulgaris* essential oils and methanol extract (MIC 15.6 and 62.5 g / ml) was observed against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Proteus vulgaris*.

The antimicrobial activities of the essential oil of *t. vulgaris* obtained from the region of Murcia were evaluated for growth control and survival of 10 pathogenic microorganisms. The results presented here may suggest that the essential oil of *T. vulgaris* possesses antimicrobial properties and is a potential source of antimicrobial ingredients for the food industry. The results show that thyme extract as well as its essential oil are strongly antimicrobial and have strong antibacterial activity.

Key words: *Thymus vulgaris* L., essential oil, antimicrobial activity, antibacterial activity

Table des matières

Résumé

Introduction1

Partie bibliographique

Chapitre I : LES PLANTES MEDICINALES ET LEURS SUBSTANCE

ANTIMICROBIENNE

I.1. Les plantes médicinales.....	5
I.1.1. Généralité.....	5
I.1.2.L'origine des plantes médicinales.....	5
I.1.3. Définition d'une plante médicinale.....	6
I.1.4. Les plantes médicinales en Algérie.....	6
I.1.5 Exemples de quelques plantes médicinales.....	7
I.1.5.1 <i>Thymus vulgaris</i>	7
I.1.5.2.Description botanique.....	7
I.1.5.3. Classification.....	8
I.1.5.4. Nom vernaculaire.....	9
I.1.5.5. Répartition géographique.....	9
I.1.5.5.1. Dans le monde.....	9
I.1.5.5.2.En Algérie.....	10
I.1.5.6. Domaine d'usage de <i>thymus vulgaris</i>	11

Chapitre II : les huiles essentielles

II.1. les huiles essentielles.....	13
II.1.1.définition.....	13
II.1.2. Répartition et localisation des huiles essentielle.....	13
II.1.2.1.Répartition.....	13
II.1.2.2. Localisation des huiles essentielles.....	13
II.1.3. Les propriétés des huiles essentielles.....	13
II.1.4.Caractéristiques physiques des huiles essentielles.....	14
II.1.5.Composition chimique des huiles essentielles.....	14
II.1.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	15
II. 1.6.1. Distillation et entrainement à la vapeur.....	15
II.1.6.2. Hydro distillation.....	16
II.1.6.3. Extraction par solvants volatils.....	17
II.1.6.4. Extraction par enfleurage.....	17
II.1.7. Domaines d'utilisation des huiles essentielles.....	17
II.1.7.1. En pharmacie.....	17
II.1.7.2.En cosmétologie.....	18
II.1.7.3.En industries agroalimentaires.....	18
II.1.7.4.En agriculture.....	18
II.1.8.Conservation des huiles essentielles.....	18

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériels & méthodes

III. 1. Matériel végétal.....	21
III.1. 1. La récolte.....	21
III.1.2. Le séchage.....	21
III.1.3. Extraction d'huiles essentielles	21
III.1.4. Souches microbiennes.....	21
III. 2. Méthode.....	23
III.2.1. Test antimicrobien (test de diffusion sur disque) (<i>Thymus vulgaris</i> obtenue de la région de Murcie).....	23
III.2.2. Test d'activité antibactérienne (<i>thymus vulgaris</i> obtenue de la région d'Iraq)	23
III.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale de bactéricide (MBC).....	24

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1. Résultats.....	27
IV.2. Discussion des résultats	31
Conclusion	34
Références bibliographiques	37
Annexes	46

Introduction

Introduction

L'homme a utilisé les plantes trouvées dans la nature comme remède à diverses maladies humaines. Les plantes médicinales sont utilisées depuis des siècles, leur utilisation a connu actuellement une région d'intérêt auprès du public. Partout dans le monde l'intérêt pour la médecine traditionnelle s'accroît constamment. Depuis la nuit des temps, l'homme s'est employé à exploiter la nature pour ses besoins médicaux et alimentaires, et au cours du développement des anciennes civilisations, l'exploitation des plantes à usage médicinale s'est développée grâce à leur savoir et à leurs expérimentations effectuées dans ce domaine, il ont utilisé les plantes médicinales d'une façon plus ou moins correcte (**RHATTA et al., 2016**). La croissance de l'industrie pharmaceutique et le développement incessant de nouveaux produits médicaux synthétiques et biologiques plus efficaces n'ont pas pour autant réduit l'importance de l'utilisation des plantes médicinales. Au contraire, la croissance démographique dans le monde et l'intérêt croissant manifesté au niveau des nations industrialisées ont considérablement augmenté la demande spécifique aux plantes aromatiques et médicinales et à leurs produits dérivés. Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que la médecine traditionnelle couvre les besoins en soins de santé primaire de 80% de la population mondiale (**OMS, 2013**).

Les plantes médicinales sont devenues importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (**OMS, 1998**). Un intérêt considérable a été suscité aux huiles essentielles extraites à partir de plantes aromatiques et dotées d'activités antimicrobiennes vis-à-vis des microorganismes pathogènes, (**Alzoreky et Nakahava, 2003**). Les huiles essentielles ont un spectre d'activité très large due principalement à leur grande affinité grâce à leurs natures, pour cela, les activités antibactériennes de ces produits ont été rapportées dans de très nombreux travaux (**Bouzouita et al., 2008**). L'usage des huiles essentielles est largement répandu dans le domaine thérapeutique, préventif et cosmétique. Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles sont utilisées dans la conservation des denrées alimentaires. Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles de thym, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxiinfections alimentaires (**Beuchat, 1976 ; Bilgrami et al, 1992**).

Introduction

L'huile essentielle du Thym est caractérisée par un fort potentiel antimicrobien (**Cosentino et Palmas, 1999**).

L'objectif de mon travail vise à analyser deux articles scientifiques intitulés :

- 1- « Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils » et
- 2- « Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts »

Dans cette étude j'ai organisé mon travail comme suit :

- Partie bibliographique sur la plante de *Thymus vulgaris* et sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles ;
- Partie matériel et méthodes et
- Partie résultats, discussion, conclusion et références.

Partie
bibliographique
Chapitre I : les
plantes médicinales
et leurs substances
antimicrobiennes

Chapitre I Les plantes médicinales et leurs substances antimicrobienne

I.1. Les plantes médicinales

I.1.1. Généralités

Alors que la mode est à la médecine naturelle, de plus en plus de remèdes à base de plantes voient le jour. Qu'elles soient préparées en laboratoire ou chez soi, les solutions phytothérapeutiques trouvent toutes leur origine dans les plantes. Mais comment en est-on venu à les utiliser ? Dans quels cas ? Que nous promettent-elles ?

Connues depuis l'antiquité les plantes médicinales et aromatiques ou bien Les herbes ont 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**). La pharmacopée s'oriente de plus en plus vers les traitements à base de plantes car la créativité et l'efficacité de la synthèse chimique a atteint ses limites (**Iserin, 2001**). Les plantes médicinales sont utilisées pour leurs propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine (**Dutertre, 2011 et 2016**). En effet, elles sont utilisées de différentes manières, décoction, macération et infusion.

Les plantes ont constitué le premier et principal outil thérapeutique à la disposition de l'homme et cependant de nombreux siècles. Dans diverses civilisations et sur tous les continents, les pharmacopées végétales se sont développées et enrichies grâce à l'empirisme. Avec un don d'observation inégalé, les anciens ont pu mettre en évidence des propriétés curatives ou préventives des plantes médicinales qui n'ont d'ailleurs, jamais été démenties par l'usage (**Carillon, 2009**). Les plantes médicinales ont joué un rôle essentiel dans le développement de la culture humaine dans le monde. Il est estimé que les ressources de nouveaux médicaments et de nombreux médicaments modernes sont produits indirectement à partir de plantes (**Reddy et al., 2014**).

I.1.2. l'origine des plantes médicinales

Leur utilisation remonte à des milliers d'années, où l'homme utilisait les plantes pour se soigner (**Damintoti et al., 2005**). Aujourd'hui, elles sont la base de la phytothérapie et de

l'homéopathie. En effet, les plantes médicinales étant issues de la nature, il est possible d'en croiser tous les jours.

Chapitre I Les plantes médicinales et leurs substances antimicrobienne

De plus, on distingue les plantes herboristes qui sont utilisées telles quelles, de manière « traditionnelle », et les plantes qui constituent une matière première pour l'industrie pharmaceutique. Enfin, il faut savoir que la matière principale de la pharmacopée est restée végétale.

I.1.3. définition d'une plante médicinale

Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse des drogues utiles. Cela signifie qu'une de ses parties (feuille, bulbe, racine, graines, fruits, fleurs) peut être employée dans le but de guérir. Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses, leur action provient de leur composition chimique (métabolites primaires ou secondaires) ou des synergies entre les différents composés présents (Sanago, 2006). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains (Elqaj et al., 2007).

I.1.4. Les plantes médicinales en Algérie

L'Algérie possède une flore extrêmement riche et variée représentée par des plantes aromatiques et médicinales dont la plupart existe à l'état spontané. La valorisation de ces plantes demeure un domaine de grande importance pour le pays.

Le potentiel floristique Algérien représente une richesse inestimable, par sa biodiversité, ainsi que par les immenses opportunités de développement durable qu'il pourrait offrir à court et moyen terme aux générations futures. Ce patrimoine est toutefois fragile, et les menaces sont identifiées : déforestation, pollution, dégradations des parcours, désertification etc.... La région oranaise, offre un paysage botanique excentrique et très diversifié, lié aux circonstances du climat, du sol et du relief. Elle est caractérisée par de nombreuses plantes médicinales qui suscitent un grand intérêt, par leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes. Les plantes médicinales sont riches en molécules actives d'intérêt multiple mis à profit dans

plusieurs domaines y compris, la cosmétologie, la dermopharmacie, l'alimentation et les diverses industries (Bahorun, 1997).

Chapitre I Les plantes médicinales et leurs substances antimicrobienne

I.1.5. Exemples de quelques plantes médicinales

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie Parmi ces plantes on prend le *thymus vulgaris* comme un exemple.

I.1.5.1 *Thymus vulgaris*

Le genre *Thymus* parmi les 220 genres les plus diversifiés de la famille des labiées (Morales, 2002). L'espèce *Thymus vulgaris* méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales (Iserin, 2001).

Thymus vulgaris est l'un des plus populaire plantes aromatique (figure n°01) utilisé dans le monde entier, ces applications sont très vastes et touchent le domaine alimentaire et celui de la médecine traditionnelle (Adwan *et al.*, 2009).



Figure 01 : *Thymus vulgaris* (Teuscher *et al.*, 2005)

I.1.5.2 Description botanique

Plante originaire du bassin méditerranéen, elle se présente sous la forme d'un sous-arbrisseau de type vivace et particulièrement touffu, à tiges quadrangulaires et ligneuses et à feuilles

sessiles (**figure n°02**). Ces dernières sont assez petites, de forme lancéolée et de couleur grisvert. Sa taille peut atteindre une trentaine de centimètres et sa fleur affiche une teinte rosâtre. Petite, de 4 à 6 millimètres, elle se regroupe en épis foliacés et est visible de juin à octobre. La plante préfère les terrains plutôt rocailloux, secs et très ensoleillés. Le thym a une durée de vie allant de 4 à 7 ans (**LAVERGNE, 2012**).

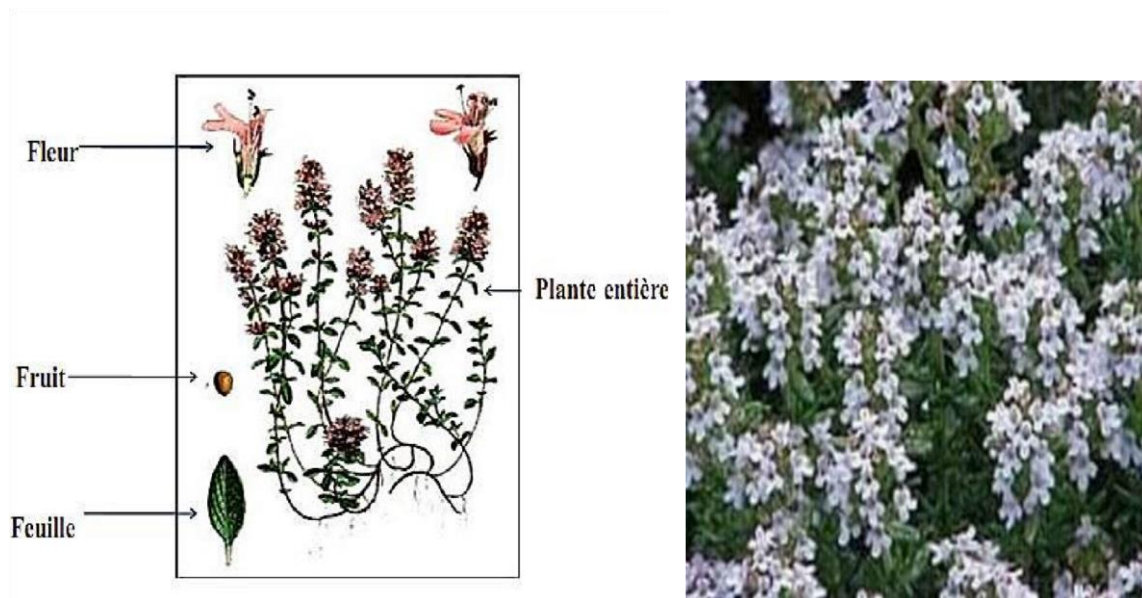


Figure 02 : Aspect morphologique de *Thymus vulgaris* L. (Iserin, 2001).

I.1.5.3. Classification : La situation botanique de l'espèce *Thymus vulgaris* L est donnée cidessous (Goetz et Ghédira, 2012).

Tableau 01 : Classification taxonomique de *Thymus vulgaris* (Goetz et Ghédira, 2012)

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

Chapitre I les plantes médicinales et leurs substances antimicrobiennes

Espèce	<i>Thymus vulgaris</i> L.
--------	---------------------------

I.1.5.4. Nom vernaculaire :

Les noms vernaculaires de l'espèce *Thymus vulgaris* sont les suivants :

- **Arabe** : saatar, zaatar (en arabe زعتر ou صعتر)
- **Français** : thym vulgaire, thym de jardins, farigoule, farigoule et barigoule.
- **Allemande**: Thymian, Echter Thymian, Garten thymian, Römischer thymian, romischer quendel, welscher thymian kutteelkraut.
- **Anglais** : common thym, garden thym, (Teuscher et al., 2005).

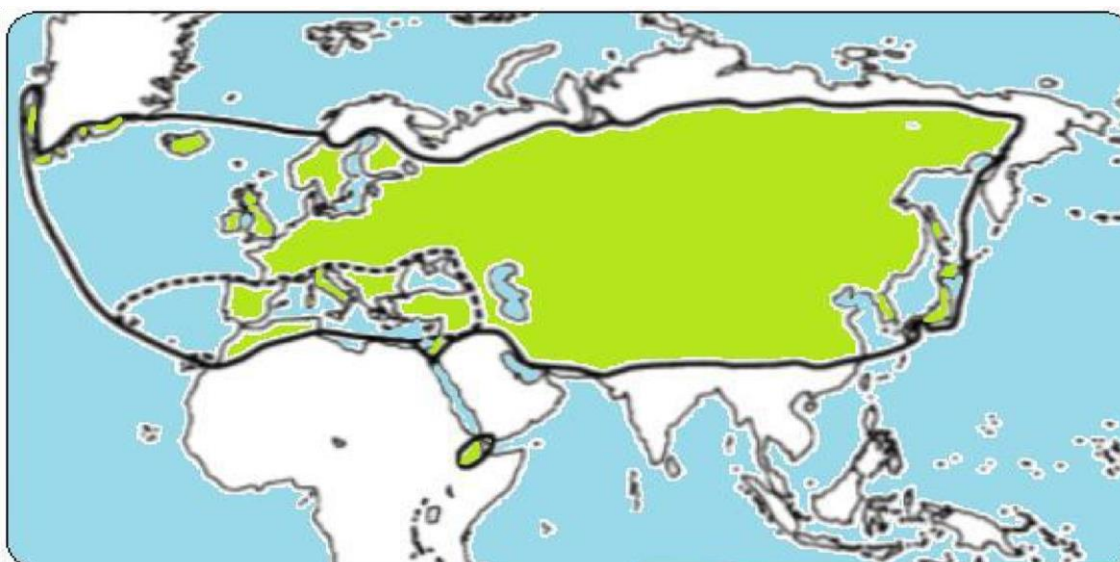
I.1.5.5. Répartition géographique

L'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne (BENKHNIGUE et al., 2011).

I.1.5.5.1. Dans le monde

Le thym est réparti entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée (Mabberley, 1997) (figure n°03). La région de l'ouest méditerranéen est considérée comme étant le centre de l'origine du genre

Thymus ; l'espèce *T. vulgaris* provient particulièrement du sud de l'Europe, de l'Espagne à l'Italie (Morales, 1997 ; Peter, 2004).



Chapitre I les plantes médicinales et leurs substances antimicrobienne

Figure 03 : la distribution géographique de thym dans le monde (Le cercle noir représente la zone de distribution du genre *Thymus* dans le monde) (STAHL-BISKUP et SAEZ, 2002).

I.1.5.5.2.En Algérie

Le genre *thymus* inclut presque 300 espèces dans le monde parmi lesquelles une variabilité importante localisées en Algérie (CHIKHOUNE, 2007).

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique. Le *Thymus* regroupe 12 espèces qui sont réparties le long du territoire national, du Nord algérois à l'Atlas saharien, et du constantinois à l'oranais (Kabouche *et al.*, 2005).

Ces espèces sont : *Thymus fontanesii*, *Thymus commutatus* (Ball.), *Thymus dreatensis*, *Thymus numidicus*, *Thymus guyonii*, *Thymus lanceolatus*, *Thymus pallidus*, *Thymus glandulosus*, *Thymus hirtus*, *Thymus algeriensis*, *Thymus ciliatus*, et *Thymus capitatus*(L).

Tableau 02 : Localisation de quelques espèces de genre *Thymus* en Algérie

Espèces	Auteur	Localisation
<i>Thymus capitatus</i>	(L.) (Hoffman et Link)	Rare dans les monts de Tlemcen
<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie- Tunisie.
<i>Thymus commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran

Chapitre I les plantes médicinales et leurs substances antimicrobienne

<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans : Le sous-secteur de l'atlas tellien La grande et la petite Kabylie De Skikda à la frontière tunisienne Tell constantinois
-------------------------	--------	---

Chapitre I les plantes médicinales et leurs substances antimicrobienne

I.1.5.6. domaine d'usage de *thymus vulgaris*

L'utilisation du thym dans la vie humaine date depuis très longtemps grâce à ses diverses propriétés importantes (HADDOUCHE, 2011).

Selon (Jiminez-Arellanes *et al.*, 2006), Le Thym est excellent contre plusieurs maladies y compris la pleurésie, les déficiences nerveuses, l'hypotension, la chlorose, les infections pulmonaires, la tuberculose et l'asthme. Il est considéré aussi comme l'un des remèdes populaires les plus utiles et efficaces, dans le traitement des affections respiratoires ; rhume, angine, grippe et la bronchite On s'en sert aussi pour traiter les parasites intestinaux, les infections urinaires. Il possède des vertus antiseptique utilisées pour soigner les infections pulmonaires, calmes les toux quinteuses, diminue les sécrétions nasales et soulage les problèmes intestinaux (FREDERICH, 2014 ; SAIDJ, 2007). Les extraits de thym ont montré une large activité antibactérienne en inhibant la croissance des bactéries à Gram positif et Gram négatif (QARALLEH *et al.*, 2009). Le thym est une herbe aromatique connue par leur odeur agréable, il entre dans la composition des produits cosmétiques. Son HE riche en thymol 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, ainsi que les HEs de thym lutterait contre la perte de cheveux (SAIDJ, 2007 ; ZRIRA, 2003 ; BENTAYEB, DJEMMAL, 2014).

En usage interne, les parties aériennes sont utilisées en décoction ou en infusion dans le traitement de la dyspepsie et autres troubles gastro-intestinaux, de la toux, des irritations de l'appareil respiratoire et des rhumes mais aussi, des infections des voies urinaires (Hashim et Gamil, 1988 ; Polese, 2006).

En usage externe, elles traitent les affections liées à l'inflammation telles que les rhumatismes, les gonflements musculaires, les piqûres d'insectes et les douleurs (Namsa *et al.*, 2009).

Chapitre II : Les Huiles essentielles

II.1. Les huiles essentielles

Connues des civilisations anciennes et aujourd'hui scientifiquement reconnues, les huiles essentielles sont des extraits naturels de plantes puissants et d'une extraordinaire efficacité, tant sur le plan de la santé que de la beauté et du bien-être. En les combinant, il est possible de mettre au point des synergies aromatiques inédites dont les vertus et propriétés répondent à des besoins ciblés comme, par exemple, le renforcement des défenses immunitaires, la relaxation, la stimulation, le soulagement de douleurs articulaires et musculaires.

II.1.1. Définition

Une huile essentielle est un extrait de plante aromatique liquide, concentré et complexe. Connues aussi sous le nom d'essences ou d'huiles éthérées, ce sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes.

C'est le résultat de la distillation à la vapeur d'eau de plantes ou d'arbres aromatiques pour extraire l'essence. **Huile essentielle = essence distillée**

II.1.2.Répartition et localisation des huiles essentielles II.1.2.1.Répartition

:

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal et surtout chez les végétaux supérieurs (BELLAKHDAR, 1997).

II.1.2.2. Localisation des huiles essentielles

Les essences sont généralement renfermées dans les fleurs, feuilles, graines, tiges, bois, racines et écorces (Paris et Moyses, 1965).

II.1.3. Les propriétés des huiles essentielles

Les huiles essentielles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba et Kunicka, 2003).

Des travaux antérieurs sur l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* ont montré qu'elle possédait un effet inhibiteur considérable sur les BMR telles que *P. aeruginosa* (souche résistante à 19 antibiotiques) (Nascimento *et al.*, 2000). La nature antibactérienne des huiles essentielles est

Chapitre II

principalement due à leur fort contenu en composés phénoliques, à savoir, le thymol, l'eugénol et le carvacrol. Ce dernier est le plus actif de tous (**Pauli, 2001 ; Zhiri, 2006 ; Kaloustian et al., 2008**).

Les huiles essentielles aident à traiter les petites indispositions de la vie de tous les jours. Outre leur action curative, elles opèrent de manière préventive en stimulant le système Immunitaire afin que l'organisme lutte plus efficacement contre les infections bactériennes et virales. Parmi les propriétés les plus connues, on citera la propriété antiseptique. A l'heure où les germes microbiens deviennent de plus en plus résistants, ce qui implique pour l'industrie pharmaceutique de trouver des antibiotiques de plus en plus puissants (mais aussi de plus en plus destructeurs de la flore saprophyte responsable de notre immunité), les huiles essentielles offrent une véritable alternative.

II.1.4. Caractéristiques physiques des huiles essentielles

Les HEs possèdent en commun un certains nombres de propriétés physiques (**Bardeau, 1976 ; Legrand, 1978 ; Lemberg, 1982 ; Bruneton, 1999**) :

- Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont Liquides et parfois visqueux ou cristallisées.
- Leur volatilité les oppose aux « huiles fixes » (**Roux et Catier, 2007**). Elle est liée à leur caractère odorant.
- A basse température, certaines cristallisent.
- Généralement incolores ou jaune pale.
- Elles sont plus légères que l'eau –densité inférieure à 1.
- Elles ne se dissolvent pas dans l'eau.
- Solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles.
- Leur indice de réfraction souvent élevé avec un pouvoir rotatoire.
- Elles sont très altérables et sensibles à l'oxydation.

II.1.5. Composition chimique des huiles essentielles

- Contrairement à son nom, elle ne contient aucun corps gras, mais uniquement des molécules aromatiques naturelles.
- La composition chimique d'une huile essentielle est complexe contenant de nombreuses espèces chimiques, Plus de 60 molécules différentes peuvent entrer dans la composition chimique d'une huile essentielle (**Degryse et al., 2008**).

Chapitre II

On y trouve de nombreux constituants qui appartiennent principalement à deux types chimiques : le groupe des terpénoïdes. Au sens strict, les terpènes sont des *hydrocarbures* mais de nombreux dérivés (alcools, aldéhydes, cétones, acides), de structure apparentée, sont considérés comme des composés terpéniques. Et le groupe des composés aromatiques dérivés du phenylpropane (**Benayad, 2008 ; Guinoisseau, 2010**).

II.1.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales (**Sallé, 2004**).

Le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (les flavonoïdes ou les tanins), qui détermine la qualité des huiles essentielles (**Tongnuanchan et Benjaku, 2014**).

II. 1.6.1. Distillation et entraînement à la vapeur :

C'est la méthode la plus couramment utilisée pour la fabrication des HEs. Elle consiste à faire passer de la vapeur d'eau à travers la matière végétale placée dans l'alambic. La vapeur provoque l'ouverture des cavités des plantes qui libèrent ainsi les molécules des huiles volatiles. La température doit être ajustée et contrôlée pour ne pas « brûler » l'élément végétal ni dénaturer l'huile essentielle. La vapeur qui contient l'HE est dirigée à travers un système de

Refroidissement (serpentin) où elle se liquéfie, ce qui sépare de fait l'huile essentielle de l'eau.

La figure 04 présente un schéma de la distillation des huiles essentielles à la vapeur.

Chapitre II

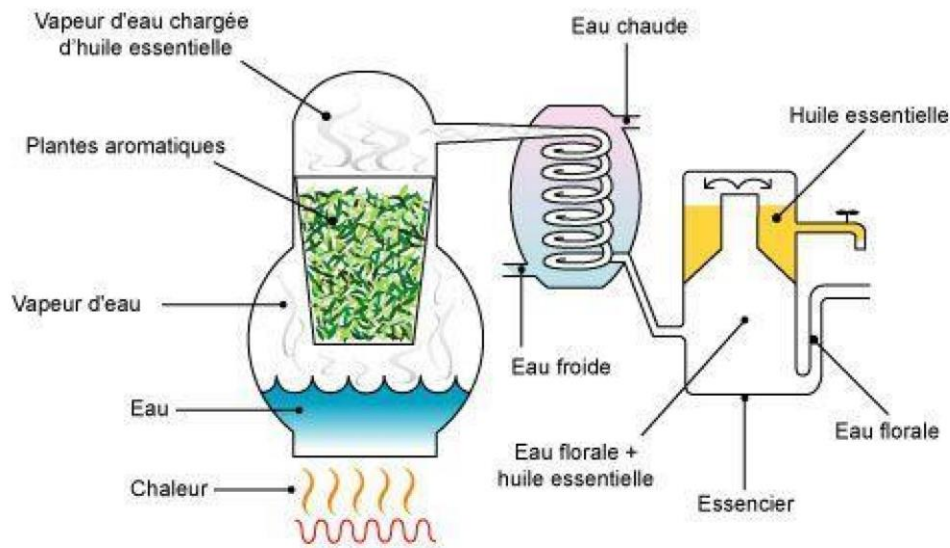


Figure 04 : Schéma de distillation des huiles essentielles à échelle industrielle par entraînement à la vapeur d'eau. (Bassereau *et al.*, 2007)

II.1.6.2. Hydro distillation

Cette appellation désigne une autre forme de distillation à la vapeur : la vapeur est introduite par le haut pour passer à travers la matière végétale choisie. La condensation du mélange de vapeur contenant l'huile se produit sous la grille retenant la matière végétale. Cette méthode utilise moins de vapeur, le processus d'obtention est plus court et le rendement en huile est meilleur. La figure 05 présente le schéma du principe d'hydro distillation.

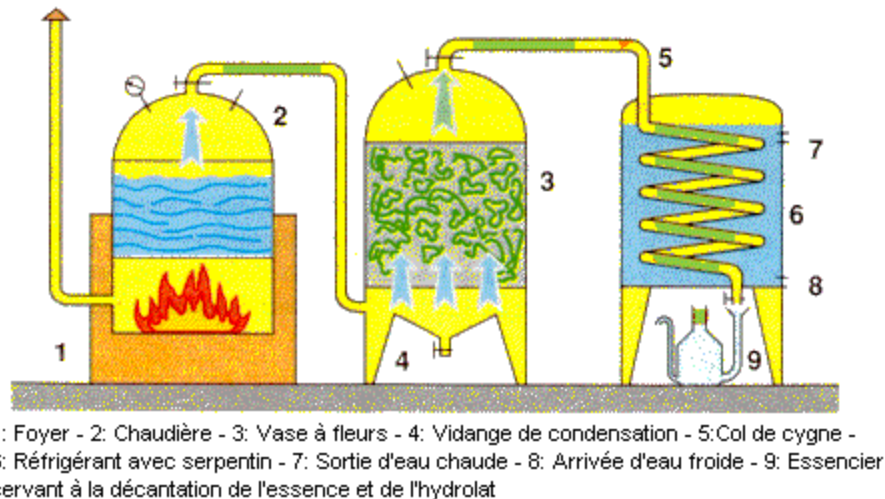


Figure 05 : Schéma du principe de la technique d'hydro distillation (Rassem, 2016)

Chapitre II

II.1.6.3. Extraction par solvants volatils

Consiste à extraire l'huile essentielle d'éléments végétaux qui ne supportent pas la chaleur. À l'aide d'un solvant volatil (éthanol, hexane) qui ne se mélange pas avec l'eau. L'H.E est très concentrée.

II.1.6.4. Extraction par enfleurage

Une méthode longue et complexe qui utilise une matière grasse végétale ou animale purifiée sur laquelle est placé un lit de pétales de fleurs. Au bout de quelques jours de contact corps gras/pétales de fleurs, on procède à un pressage du mélange, ce qui produit une matière huileuse très aromatique, puis à un

« rinçage » de la pommade d'enfleurage (composée de gras et de parfum) avec de l'alcool. Lorsque l'alcool s'est évaporé du mélange, il ne reste que l'huile essentielle. Les HES se dissolvent dans l'alcool sans la graisse. Cette méthode d'extraction est à l'origine de la fabrication des grands parfums.

II.1.7. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

Par leurs nombreuses et diverses propriétés, les plantes aromatiques et leurs essences trouvent leurs emploi dans de multiples domaines telles que : la pharmacie, l'agriculture et d'autres (Richard, 1992).

Les huiles essentielles sont aussi très sollicitées dans les parfumeries et même dans la gastronomie pour leur arôme et parfois pour la saveur qu'elles peuvent apporter aux aliments.

II.1.7.1. En pharmacie

De nombreuses HES se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produit

Les huiles essentielles

pharmaceutique : sirop, gouttes, gélules. Elles rentrent aussi dans la préparation d'infusion telle que : le thym, la menthe et autres. Les propriétés pharmacologiques des HEs leur confèrent un pouvoir antiseptique contre les bactéries, champignons et levures. Le pouvoir antifongique des huiles essentielles des plantes médicinales a été mis en évidence par de nombreux chercheurs contre les Champignons pathogènes et opportunistes (**De Bellerbeck, 2002**). Les huiles essentielles ont été considérées comme les agents antimicrobiens les plus Efficaces présents dans les plantes (**Essawi et al, 2000**). Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures (**Sipailiene et al, 2006**). L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est due principalement à leur Composition chimique et en particulier à la nature de leurs composés majoritaires. En Effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles se classe dans L'ordre décroissant suivant la nature de leurs composés majoritaires :

Chapitre II

Phénol > alcool > aldéhyde > cétone > oxyde > hydrocarbures > esters (**Lee et al., 1971 ; Flamini et al., 1999**). Les huiles essentielles ont une forte activité antibactérienne, Certaines huiles essentielles ont une action bactériolytique et non pas simplement bactériostatique comme le cas des huiles essentielles, de thym (**Girard, 2010**).

II.1.7.2. En cosmétologie

Les HEs sont employés en tant qu'agent conservateurs grâce à leurs propriétés antimicrobiennes qui permettent d'augmenter la durée de conservation du produit. Et grâce à leurs caractéristiques odorantes en raison de leur forte volatilité permet de ne pas laisser de trace grasse. Ils sont utilisés dans la formulation des parfums de produits d'entretien personnels ou ménagers domestiques ou industriels (**Aburjai et natsheh, 2003**).

II.1.7.3. En industries agroalimentaires

En industrie alimentaire, on cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure.

Une nouvelle technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside dans l'utilisation des huiles essentielles (**Lis-Balchin et al., 1998**).

La part des HEs dans l'aromatization ne cesse de croître.

II.1.7.4. En agriculture

Les huiles essentielle

Les pesticides naturels basés, notamment, sur les huiles essentielles représentent une alternative intéressante pour la protection des cultures contre les insectes mais également contre les adventices et les champignons (**Isman, 2000 ; Dayan et al., 2009**).

II.1.8.Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances sensibles et très délicates, ce qui rend leur conservation difficile et obligatoire dans le but de limiter les risques de dégradation, ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons opaques, de faible volume en aluminium, en acier inoxydable ou en verre brun à l'abri de la chaleur et de la lumière (**Valnet, 2000**).

Partie Expérimentale
Chapitre III :
Matériel & Méthodes

III. 1. Matériel végétal

On a cité les étapes utilisées par les deux articles III.1.1. La récolte

- 1- La Plante aromatique du genre *Thymus*, *Thymus vulgaris* (chénotype du thymol) a été obtenue à partir d'une culture expérimentale de l'Institut Murcien d'Investigation et d'Agriculture. Développement (IMIDA) à Torreblanca (37 470N - 0 540W et 30 m d'altitude) dans la région de Murcie (Espagne).
 - 2- Les Parties aériennes de graines de *Thymus vulgaris* ont été achetées sur le marché local de la ville de Mossoul, Ninive province, République d'Iraq et identifiées au Département de Biologie, Collège d'éducation, Université de Mossoul. Bon spécimen des plantes (n ° 103, 104, respectivement) ont été séchées et déposées à l'herbier du Département de Biologie, Université de Mossoul.
- #### III.1.2. Le séchage
- Les anis et les parties aériennes séchées de la plante aromatique de *Thymus vulgaris* de Murcie et d'Iraq ont été soumis à la distillation à la vapeur dans un appareil de type Clevenger pendant trois heures.

III.1.3. Extraction d'huiles essentielles

- L'huile essentielle obtenue du *Thymus vulgaris* de Murcie a été séchée avec du sulfate de sodium anhydre et conservées dans des flacons ambrés à 4°C jusqu'à l'analyse chromatographique.
 - L'huile essentielle obtenue du *Thymus vulgaris* d'Iraq a été séparée de l'eau et séchée sur Na₂SO₄ anhydre puis stockée à 4°C jusqu'à utilisation (donne 2,07% d'anis et 1,67% de parties aériennes de thym).
- #### III.1.4. Souches microbiennes
- Les souches bactériennes ont été utilisées pour évaluer les propriétés antimicrobiennes des échantillons d'essai de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* de Murcie, sept souches de test Gram négatif et trois souches gram positif (**Tableau 03**).

Chapitre III Méthodes

Matériel &

Tableau 03 : souches bactériennes utilisées

Toutes les souches sont obtenues de la Collection espagnole de cultures types et Conservés dans du lait écrémé à 20°C (Difco Laboratories, Detroit, MI).

Bactérie	Souches	Références
Gram négatif	<i>Salmonella enteritidis</i>	CECT 4155
Gram négatif	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	CECT 443
Gram négatif	<i>Escherichia coli</i> serotype O157: H7	CECT 4267
Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	CECT 516
Gram négatif	<i>Yersinia enterocolitica</i> sérotipe O : 8 ; biotype 1	CECT 4315
Gram négatif	<i>Shigella flexneri serovar</i> 2a	CECT 585
Gram négatif	<i>Shigella sonnei</i>	CECT 457
Gram positif	Sérotipe <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> 4b	CECT 935
Gram positif	serotype <i>L. monocytogenes</i> 1 / 2c	CECT 911
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 239

Les bactéries ont été cultivées dans un bouillon de soja tryticase (Difco Laboratoires, Detroit, MI) et incubées à 37°C. (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157 : H7, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. aureus*) ou à 29 °C (*Yersinia enterocolitica*).

- D'autre part, Tous les micro-organismes ont été obtenus auprès du Département de biologie, Collège des sciences, Université de Mossoul, Irak. (**Tableau 04**)

Chapitre III Méthodes

Matériel &

Tableau 04 : organisme d'essai obtenu auprès de l'université de Mossoul Iraq

bactéries Gram-négatives	bactéries Gram-positives
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Salmonella typhi</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

Les cultures de bactéries ont été maintenues dans leurs inclinaisons de gélose appropriées à 4°C tout au long de l'étude et utilisé comme cultures mères.

III. 2.Méthode

III.2.1. Test antimicrobien (test de diffusion sur disque) (*Thymus vulgaris* obtenue de la région de Murcie)

Des disques en papier filtre (Whatman n ° 1, 6 mm de diamètre) contenant 15 µl de l'huile essentielle ont été appliqués sur la surface de plaques d'agar qui ont été préalablementensemencées par étalement de 0,1 ml de culture pendant une nuit. Les plaques ont été incubées une nuit à la température appropriée, et le diamètre de la zone d'inhibition résultante a été mesuré en millimètres. Les résultats indiqués dans le **tableau 05** représentent la zone nette d'inhibition comprenant le diamètre (6 mm) du disque en papier. L'échelle de la mesure était la suivante (diamètre du disque inclus) : La zone d'inhibition supérieure à 20 mm est fortement

inhibitrice ; <20– La zone d'inhibition de 12 mm est modérément / légèrement inhibitrice ; et <12 mm n'est pas inhibiteur (Meena & Sethi, 1994 ; Rota et al., 2004).

III.2.2. Test d'activité antibactérienne (*Thymus vulgaris* obtenue de la région d'Iraq)

L'activité antibactérienne a été déterminée sur la base d'un micro puits méthode de dilution (Swanson et al., 1992).

Les Souches bactériennes ont été mis en culture pendant une nuit à 37 ° C sur un bouillon Mueller Hinton et ajusté à une densité finale de 10⁶ cfu / ml, et utilisé comme inoculum.

L'huile essentielle était dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) puis dans le bouillon Mueller Hinton pour atteindre une concentration finale de 500,0 g / ml.

Chapitre III Méthodes

Matériel &

Des dilutions doubles en série ont été effectuées dans un intervalle de concentration de 7,8 À 500,0 g / ml dans des tubes à essai stériles contenant le bouillon Mueller Hinton.

Les plaques à 96 puits ont été préparées en les distribuant dans chaque puits 95 l de bouillon Mueller Hinton et 5 l de l'inoculum de la bactérie A 100 l (50 l + 50 l en cas de combinaison) à partir de l'huile essentielle végétale préparé ont été ajoutés dans les premiers puits. Ensuite, 100 l de leurs dilutions en série a été transféré dans six puits consécutifs. Le dernier puits contenant 195 l de bouillon Mueller Hinton sans composés et 5 l de l'inoculum sur chaque bandelette ont été utilisés comme des contrôleurs négatifs. Le volume final de chaque puits était de 200 l. Maxipime (Bio analyse) à la concentration de 500,0 à 7,8 g / ml était préparé dans un bouillon M- H et utilisé comme médicament standard pour le contrôle positif. Le contenu de chaque puits a été mélangé sur un agitateur de plaques à 300 tr / min pendant 20 s avant l'incubation à 37°C pendant 24 h.

III.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale de bactéricide (MBC)

L'huile essentielle de *thymus vulgaris* obtenue de la région de Murcie qui montre des activités antimicrobienne (zone d'inhibition supérieure à 12 mm) a été criblés pour la détermination de MIC et MBC par la méthode de dilution du tube contre les mêmes microorganismes (Rota et al., 2004). La quantité appropriée de l'huile essentielle dissoute dans de l'éthanol à 95% a été

ajouté au bouillon de trypticase de soja. Des dilutions en série ont été préparées à partir de ce bouillon et ont été puis inoculé avec des bactéries à une concentration finale de 10⁶ cellules / ml.

La croissance de chaque culture a été surveillée par étalement diluée appropriée aliquotes de la culture (numérations viables) sur trypticase soja gélose à des intervalles de temps spécifiques. Dans chaque cas, des bouillons témoins contenant 3% (vol / vol) de solvant (95% d'éthanol) ont également été préparé. Après une nuit d'incubation, le MIC a été lu. CMI a été calculé.

La CMI était la concentration la plus faible à laquelle les bactéries n'ont pas réussi à se développer dans le BST, mais une croissance bactérienne a été observée après avoir transféré 100 µl à TSA. De même, le MBC était la concentration la plus faible à laquelle les bactéries ne se sont pas développées au TSB et le transfert ultérieur à TSA., (Janssen et al., 1987).

La plus basse concentration de l'huile essentielle de *thymus vulgaris* obtenue de la région d'Iraq qui ne montre aucune croissance a été prise comme sa concentration minimale inhibitrice (CMI)

Chapitre III

Méthodes

Matériel &

et confirmée en plaçant des échantillons de 5 l provenant de puits clairs sur Mueller Hinton milieu d'agar. Le sel de tétrazolium incolore agit comme un accepteur d'électron et est réduit à un produit formazan de couleur rouge par des organismes biologiquement actifs (Eloff, 1998) OÙ bactérien. La croissance a été inhibée, la solution dans le puits est restée limpide après incubation avec INT.

Chapitre IV :

Résultats et discussion

Là aussi, on a cité les résultats obtenus par les deux articles et on les a discutés

IV.1. Résultats

Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne in vitro de l'huile essentielle du *thymus vulgaris* obtenue de la région de Murcie a été étudié contre 10 microorganismes pathogènes en utilisant la Technique de diffusion sur papier filtre sur disque d'agar.

L'huile essentielle a montré une forte activité (zone d'inhibition supérieure à 20 mm), activité modérée (inhibition zone <20–12 mm) et aucune inhibition (zone <12 mm). Les résultats indiqués dans le **tableau 05** représentent la zone nette d'inhibition comprenant le diamètre (6 mm) du disque en papier.

Tableau 05 : Zones d'inhibition de la croissance (mm) montrant une activité antibactérienne pour l'huile végétale de *thymus vulgaris* obtenue de la région de Murcie ; diamètre du disque 6,0 mm

L'huile essentielle	Souches testées									
	<i>S.e.</i>	<i>S.t.</i>	<i>E.c-1</i>	<i>E.c-2</i>	<i>L.m-1</i>	<i>L.m-2</i>	<i>Y.e.</i>	<i>S.f.</i>	<i>S.s.</i>	<i>S.a.</i>
<i>Thymus vulgaris</i> (thymol Ch)	32.0	36.0	19.6	28.3	43.0	35.0	31.3	29.6	29.6	45.0

S. e.: *S. enteritidis*; *S. t.*: *S. typhimurium*; *E. c-1*: *E. coli* O157:H7; *E. c-2*: *E. coli*; *L. m-1*: *L. monocytogenes* (4b);

L. m-2: *L. monocytogenes* (1/2c); *Y. e.*: *Y. enterocolitica*; *S. f.*: *S. flexneri*; *S. s.*: *S. sonnei*; *S. a.*: *S. aureus*.

En ce qui concerne l'inhibition de la croissance l'huile essentielle de *thymus vulgaris* obtenue de la région de Murcie a montré une forte activité pour neuf des dix souches testées. Cependant, des données plus précises sur les propriétés antimicrobiennes ont été obtenues grâce à la détermination des bactéries bactériostatiques et les concentrations bactéricides.

La minimum concentration inhibitrice (CMI ; µl huile / ml de milieu) et concentration bactéricide minimale (MBC ; µl huile / ml moyen) (contre 10 microorganismes). Les résultats indiqués dans le **tableau 06** représentent la Concentration minimale inhibitrice (MIC) et

concentration minimale de bactéricide (MBC) (ul/mL) de l'huile végétale de *thymus vulgaris* obtenue de la région de Murcie.

Tableau 06 : la Concentration minimale inhibitrice (MIC) et concentration minimale de bactéricide (MBC) (ul/mL) de l'huile végétales de *thymus vulgaris* obtenue de la région de Murcie

L'huile essentielle	Souches testées											
	<i>S.e.</i>		<i>S.t.</i>		<i>E.c-1</i>		<i>E.c.2</i>		<i>L.m-1</i>		<i>L.m-2</i>	
<i>Thymus vulgaris</i> (thymol ch)	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	<0.2	1.2	<0.2	<0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
	<i>Y. e.</i>		<i>S.f.</i>		<i>S.s.</i>		<i>S.a</i>					
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC				
	<0.2	0.5	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2				

S. e.: *S. enteritidis*; *S. t.*: *S. typhimurium*; *E. c-1*: *E. coli O157:H7*; *E. c-2*: *E. coli*; *L. m-1*: *L. monocytogenes(4b)*; *L. m-2*: *L. monocytogenes(1/2c)*; *Y.e.*: *Y.enterocolitica*; *S. f.*: *S. flexneri*; *S. s.*:*S. sonnei*; *S. a.*: *S. aureus*; *NT*: non testé.

T. vulgaris obtenue de la région de Murcie avait moins d'activité contre ces trois pathogènes : *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica* et *S. flexneri* avec MIC (60,5 UI / ml) et MBC (60,8 UI / ml). Dans le cas de *S. enteritidis* et *E. coli O157 :H7*, l'huile essentielle de *T. vulgaris* (58 %) a montré une inhibition de la croissance et MIC et MBC similaires .

Dans l'huile de *T. vulgaris* (thymol ch.), 47 composants ont été identifiés, ce qui représentait environ 96,1% du total constituants détectés. Les principaux constituants de l'huile étaient le thymol (57,7%), le p-cymène (18,7%) et le carvacrol (2,8%). D'autres composants étaient présents en quantités inférieures plus de 2%. En particulier, les phénols étaient les plus

abondants groupe composé de l'huile (61,8%). Les résultats de l'analyse qualitative et quantitative de l'HE de *thymus vulgaris* sont répertoriés dans le **tableau 07**.

Tableau 07 : les principaux composants chimique de l'huile essentielle de *thymus vulgaris*

<i>Thymus vulgaris</i> (thymol ch)	Composants			
	thymol	p-cymène	carvacrol	phénol
	57,7%	18,7%	2,8%	61,8%

Après cela, le but du présent travail était d'évaluer comment l'efficacité bactériostatique et bactéricide de l'huile essentielle de thym a été affectée par la concentration de ses principaux composés volatils.

Les activités antibactériennes de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* obtenue de la région d'Iraq ont été dosées in vitro par une méthode de micro-dilution en bouillon contre neuf Bactérie pathogène. **Le tableau 08** résume l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *thymus vulgaris*.

Tableau 08 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *thymus vulgaris* obtenue de la région d'Iraq

Microorganismes	Gram +/-	Valeur MIC (ug/ml) de thymus vulgaris	Valeur MIC de Maxipime
<i>Staphylococcus aureus</i>	G+	31.2	7.8
<i>Bacillus cereus</i>	G+	15.6	>500.0
<i>Escherichia coli</i>	G-	62.5	15.6
<i>Proteus vulgaris</i>	G-	31.2	62.5
<i>Proteus mirabilis</i>	G-	62.5	62.5

<i>Salmonella typhi</i>	G-	250.0	>500.0
<i>Salmonella typhimurium</i>	G-	125.0	>500.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G-	500.0	31.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G-	>500.0	>500.0

Selon les résultats, l'huile essentielle de thym s'est avérée être actif contre toutes les bactéries pathogènes sauf *Pseudomonas aeruginosa*. L'activité antibactérienne la plus forte a été observée contre *Bacillus cereus* avec une valeur CMI de 15,6 g / ml suivi de *Staphylococcus aureus* et *Proteus vulgaris* CMI 31,2 g / ml.

Pseudomonas aeruginosa a résisté à l'huile essentielle de thym, extraits de méthanol et le médicament standard.

Staphylococcus aureus a montré la meilleure sensibilité contre l'extrait de méthanol de *Thymus vulgaris* obtenue de la région d'Iraq avec une valeur MIC de 15,6 g / ml (**tableau 09**) suivi de *Bacillus cereus* et *Proteus vulgaris* MIC 31,2 g / ml.

Tableau 09 : activité antibactérienne de l'extrait de méthanol de *thymus vulgaris* obtenue de la région d'Iraq

Microorganismes	Gram +/-	Valeur MIC (ug/ml) extrait de méthanol de thymus vulgaris	Valeur MIC de Maxipime
<i>Staphylococcus aureus</i>	G+	15.6	7.8
<i>Bacillus cereus</i>	G+	31.2	>500.0
<i>Escherichia coli</i>	G-	250.0	15.6
<i>Proteus vulgaris</i>	G-	31.2	62.5
<i>Proteus mirabilis</i>	G-	62.5	62.5
<i>Salmonella typhi</i>	G-	62.5	>500.0

<i>Salmonella typhimurium</i>	G-	250.0	>500.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G-	> 500.0	31.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G-	>500.0	>500.0

IV.2. Discussion des résultats

La plupart de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du genre *Thymus* semblent être associées à des composés phénoliques (thymol et carvacrol), ces résultats sont d'accord avec ceux rapportés par d'autres auteurs (**Consentino et al., 1999; Davidson et Naidu, 2000; Skocibusic, Bezic, Et Dunkic, 2006**). De cette manière, et par rapport aux huiles dans lequel le thymol est le composant définissant le chémotype, il est intéressant de noter que, pour certains micro-organismes testés, une concentration élevée dans les composants ne conduisent pas nécessairement à la meilleure bactériostatique et efficacité bactéricide de l'huile essentielle du thym.

Les activités antibactériennes de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et l'extrait de méthanol pourraient être associés à la présence de composés phénoliques comme le carvacrol, le thymol, le -terpinène et p-cymène, qui auraient tous des propriétés antibactériennes.

Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces (**Zhiri, 2006 ; Mebarki, 2010**).

Dorman et Dreans (2000) ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne contre 25 genres de bactéries testées. Aussi, des études réalisées par l'organisation mondiale de la santé (**OMS, 1999**) ont également montré que ce constituant possède une forte activité antifongique et antibactérienne contre de nombreuses espèces y compris les bactéries étudiées.

De nombreux facteurs écologiques tels que la température, l'humidité relative, l'insolation et la nature du sol peuvent influencer la composition chimique des huiles essentielles (**Oliveira et al., 2005**).

La période de la récolte des plantes peut avoir un effet sur l'activité antimicrobienne, dans l'étude approfondie de **(Bounatirou et al., 2007)** sur l'effet inhibiteur des huiles essentielles du *Thymus* durant la période de la fleuraison, la plante exerce un effet inhibiteur plus important.

Les Valeurs MIC montrées par l'huile essentielle de *thymus vulgaris* obtenue de la région d'Iraq étaient dans le périmètre de 15,6 à 500,0 g / ml et de 7,8 à 62,5 g / ml en ce qui concerne le médicament standard Maxipime **(tableaux 08 et 09)**.

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* se révèlent les plus résistantes, cela est liée à sa grande capacité de développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, d'où son implication fréquente dans les infections hospitalières **(Mann et al., 2000)**.

Les bactéries Gram-positive *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* étaient plus sensibles à l'huile essentielle de *thymus vulgaris* obtenue de la région d'Iraq que les bactéries Gramnégative sauf *Proteus vulgaris*.

Il a été fréquemment rapporté que les bactéries Gram-positives sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram-négatives **(Mann et al., 2000)**.

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a inhibé la croissance bactérienne.

Les valeurs CMI indiquent que l'huile essentielle du Thym était efficace.

Certaines études ont conclu que les huiles essentielles entières ont une plus grande activité antibactérienne que les principaux composants mixte **(Gill, Delaquis, Russo et Holley, 2002)**, qui suggèrent que les composants mineurs sont essentiels à l'activité et peut avoir un effet synergique ou une influence potentielle sur l'huile essentielle.

Ces résultats confirment l'utilisation potentielle de l'huile essentielle du thym dans l'industrie alimentaire pour la conservation des denrées alimentaires contre les bactéries et pour augmenter la durée de conservation des denrées alimentaires.

Conclusion

Conclusion

Les huiles essentielles et les extraits des plantes sont utilisés depuis des milliers d'années (Jones, 1996), en particulier dans la conservation des aliments, produits pharmaceutiques, médecines alternatives et thérapies naturelles (Lis-Balchin et Deans, 1997). Il est reconnu depuis longtemps que certaines huiles essentielles végétales présentent des propriétés antimicrobiennes (Finnemore, 1926) et il est nécessaire d'étudier ces plantes scientifiquement, qui ont été utilisés, en médecine traditionnelle pour améliorer la qualité des soins. Les huiles essentielles sont potentielles sources de nouveaux composés antimicrobiens, en particulier contre les bactéries pathogènes (Prabuseenivasan et al., 2006).

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

La plante, *Thymus vulgaris* été choisie dans cette étude pour ces propriétés antibactériennes et son utilisation large en médecine traditionnelle.

L'huile essentielle de *Thymus* montre une bonne activité inhibitrice vis à vis des souches testées.

Les résultats montrent que les extraits biologiques de la plante de *thymus vulgaris* exercent un fort effet antibactérien sur les souches étudiées.

D'autres approches et études sont souhaitables à réaliser, il serait intéressant de :

- Etablir des synergies de différents composés de diverses plantes en plus d'étudier D'autres propriétés biologiques de ces plantes, à savoir les propriétés : Anti-inflammatoires, antivirales, antiparasitaires et insecticides.
- Testant d'autres méthodes d'extraction et leurs influences sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles.
- Extrayant les huiles de d'autres parties des plantes et les étudier.

- Déterminer les principes actifs présents dans ces extraits qui sont responsables de cette activité antibactérienne et de les utiliser comme médicament.
- Élargissant le spectre des propriétés biologiques que peuvent posséder les huiles

Conclusion

Essentielles en évaluant d'autres activités tant au niveau in vitro qu'in vivo telles que l'activité anti tumorale, et allélopathique.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

Aburjai, T. & Natsheh, F. M. (2003). Plants used in cosmetics, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17, 987-1000.

Adwan G., Abu-Shanab B., Adwan K., Abu-Shanab F, (2006). Antibacterial effects of nutraceutical plants growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Turk. J. Biol*, 30, 239242p.

Alzoreky, Nakahava. (2003). Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International journal of Food Microbiology*, 80, 223_230. **B**

Bahorun, T. (1997). Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural research council, Réduit, Mauritius, 83-94.

Bardeau F. (1976). La médecine par les fleurs. Ed. Robert Laffont.

Bassereau M., Chaintreau A, Dupperex S, Joulain D, Leijs H, Loesing G, OWEN N, Sherlock A, Schippa C, Thorel PJ, VEY M., (2007).GC-MS Quantification of suspected volatile allergens in fragrances. Data treatment strategies and method performances. *J Agric Food Chem*; .55:25-31.

Bellakhdar J, (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. *Edition Ibis Press, Paris*, 272p.

Benayad N. (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Université Mohammed V-Agdal, Maroc, 61.

BENKHNIGUE O., ZIDANE L., FADLI M., ELYACOUBI H., ATMANE ROCHDI A., et ALLAL DOUI R., (2011). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc), *Acta Bot. Barc.* 53: 191-216, p 192.

Références bibliographiques

BENTEYEB 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.

Bounatirou, et al., (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. ET Link. Food Chemistry, 105 : 146-155.

Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M., et Chaabouni M. (2008) .Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. Société Chimique de Tunisie. 10: 119-125.

BEUCHAT L.R. (1976). Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *J. Food. Sc.* 41, 899-902.

BILGRAMI K.S.; SINHA K.K; SINHA A.K (1992). Inhibition of aflatoxin production And growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion, and garlic extracts. *Indian. J. Med. Res.* 96, 171-175.

Bruneton J, (1999). Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 1120p

C

Carillon A, (2009). Place de la phytothérapie dans les systèmes de santé au XXIème siècle. In :
Conférence SIPAM, Djerba, Tunisie, Mars 2009, 7p

Chikhoune, A., Huiles essentielles de thym et d'origan. (2007). INA.

Consentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian *Thymus* essential oils. *Letters of Applied Microbiology*, 29, 130–135.

D

Damintoti Dicko, Karou, Mamoudou H Simporé, Jacques Yameogo, Saydou Sanon, Souleymane Traoré, Alfred S. (2005). Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du burkina faso,

Maitrise des procédés en vue d'améliorer la qualité et la sécurité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. Ouagadougou, 8-11.

Références bibliographiques

- Davidson et Naidu, 2000 ; Davidson, P. M., & Naidu, A. S. (2000).** Phyto-phenol. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* (pp. 265–294). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Dayan F., Cantrell C.L., ET Duke S.O. (2009).** Natural products in crop protection. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4022-4034.
- De Bellerbeck, 2002). De Billerbeck K.V.G., Roques C., Vanière P., et Marquier P. (2002).** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiène*, 10(3), 248-251.
- Degryse A., Delpla, I. & Voinier, M. (2008).** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles, Rapport de stage en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur du génie Sanitaire.
- Dorman H.J.D. et Deans S.G, (2000) .** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. –*J. Appl. Microbiol.* 88, 308-316.
- DUTERTRE J-M,** Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste. [Thèse d'exercice] [Bordeaux] Université Victor Segalen Bordeaux 2. (2011).
- E**
- Eloff, J.N., (1998).** A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64, 711–713.
- ELQAJ M., AHAMI A., et BELGHYTI D., (2007).** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires, Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques", (Maroc), p 22.
- Essawi, T., & Srour, M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 70(3), 343-349.
- Ettayebi, K., ElYamani, J., & Rossi-Hassani, B. D. (2000).** Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 183(1), 191-195.

F

Finnemore, H., (1926). The Essential Oils. Ernest Benn Limited, London.

Flamini G. Cioni P.L., Puleio R., Morelli I., Panizzi L. (1999). Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi.

Phytother Res., 13(4) : 349-351.

Références bibliographiques

Flamini G. Cioni P.L., Puleio R., Morelli I., Panizzi L. (1999). Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytother Res.*, 13(4) : 349-351.

FRÉDÉRICH M., janvier (2014). Les plantes qui nous soignent: de la tradition à la médecine moderne, centre interfacultaire de recherche du médicament, chargé de cours à la faculté de médecine, université de Liège, p 62.

G

Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P., & Holley, R. A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 83–92.

(Girard, 2010).

Goetz, P. Ghedira, K. (2012) Phytothérapie anti-infectieuse .Springer Science & Business Media. 394.

Guinoiseau E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action, Thèse de Doctorat, Université de Corse, 114. **H**

HADDOUCHE KH., (2011). Étude de l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus*, thèse de master en SCIENCE DES ALIMENTS, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, p19-22.

Hashim S., Gamil M, (1988). Plants and herbs between the Iraqi folk medicine and scientific research. Baghdad, Dar revolution of Press and Publication.

I

Iserin, (2001). Encyclopédie des plantes médicinales. Ed : Larousse Bourdasse. Paris. P335.

Isman M.B, (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603-608p.

J

Janssen A.M., Scheffer J.J., Baerheim Svendsen A, (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Med*, 53(5), 395-398p.

Références bibliographiques

Jiminez-Arellanes A., Martinez R., Garcia R., León-Diaz R., Aluna–Herrera J., Molina – Salinas G. ET Saïd-Fernández S. (2006). *Thymus vulgaris* as a potencial source of antituberculous compounds, *Pharmacologyonline*, 3, 569-574. **K**

Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z., Benlabed K, (2005). Comparative antibacterial activity of five *Lamiaceae* essential oils from Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*, 15(3), 129-133p.

Kalembe D., Kunicka A, (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem*, 10, 813-829p.

Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., Vergnes M.F, (2008). Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 6(3), 160-164p.

L

LAVERGNE D., décembre (2012). Guide technique des plante a parfum aromatiques et médicinales (PAM) en bio, rédaction : AGROBIO 47 association de développement de l’agriculture biologique en Lot Garonne, p 4-8.

(Lee et al., 1971)

Legrand. (1978). Manuel préparatoire en pharmacie. 8ème éd. Masson.

Lemberg. (1982). « Armoise » *Artémisia herba Alba*. *Perfumer flavorist*, 7, p58-63.

Lis-Balchin, M., Deans, S.G., (1997). Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 82, 759–762.

Lis-Balchin, M., Deans, S.G. ET Eaglesham, E., (1998). Relationship between Bioactivity and Chemical Composition of Commercial Essential Oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 98-104.

LIS-BALCHIN M.;BUCHBAUER G.; HIRTENLEHNER T. ; RESCH M. (1998) antimicrobial Activity of Pelargonium essential oils added to a quiche filling as a model food system. *Lett. Appl. Microbiol.* 27(4), 207-210.

M

Mann, C.M., Cox, S.D., Markham, J.L., (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology* 30, 294–297.

Références bibliographiques

Mabberley D.J, (1997).The plant-book: A portable dictionary of the vascular plants. Cambridge University Press, 858p.

Mebarki N., (2010). Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse antimicrobienne. Magister, Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques, Université M'hamed Bougera. Boumerdes, 1; 14; 29; 31; 51; 107.

Meena, M. R., & Sethi, V. (1994). Antimicrobial activity of essential oils from spices. *Journal of Food Science and Technology*, 31, 68–70.

Morales R, (1997). Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area. *Lagascalia*, 19(1-2), 249-262p.

Morales, R. (2002) the history, botany and taxonomy of the genus *thymus thyme: the genus thymus*, pp. 1-43.Taylor & Francis London.

N

Namsa N.D., Tag H., Mandal M., Kalita P., Das A.K, (2009). An ethnobotanical study of traditional anti-inflammatory plants used by the Lohit Community of Arunachal Pradesh, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 234-245p.

Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C., Silva G.L, (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz J Microbiol*, 31(4), 247256p.

O

Oliveira M.J., Iani F.P.C., Oliveira C.B.A., Santos M.R., Souza P.S., Santos S.C., Organisation Mondiale de la Santé (OMS), (1998). Réglementation des médicaments à base de plantes : La situation dans le monde. *WHO/TRM/98.1, Genève, Suisse, 65p.*

Organisation Mondiale de la Santé (OMS), (1999). Monographs on selected medicinal plants. Geneva, Switzerland : OMS.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS), (2013). Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023. ISBN 978 92 4 250609 9, *Genève, Suisse, 72p.*

Références bibliographiques

P

Paris R.R., Moysse H. Collection de précis de pharmacie sous la direction de M.-M. Janot : Matière médicale, 2ème édition tomes 1, 2 et 3, Ed. Masson, 1976 (ET 1667, 1971).

Peter, K. V. (Ed.). (2004). Handbook of herbs and spices (Vol). 2). Woodhead publishing.p360.

Pauli A, (2001). Antimicrobial properties of essential oil constituents. International Journal of Aromathérapie, 11(3), 126-133p.

Peter K.V, (2004). Handbook of herbs and spices. *Elsevier, 376p.*

Prabuseenivasan, S., Jayakumar,M., Ignacimuthu, S., (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine 6, 39.

Polese J.-M, (2006). La culture des plantes aromatiques. *Edition Artemis, 93p.*

Q

QARALLEH H.N., ABBOUD M.M., KHLEIFAT K.M., TARAWNEH K.A., ET ALTHUNIBAT O.Y., (2009). Antibacterial activity in vitro of *Thymus capitatus* from Jordan, revue de Pak J Pharm Sci.; 22(3):247-51, p247.

R

Rassem, H. H., Nour, A. H., & Yunus, R. M. (2016). Techniques for extraction of essential oils from plants: a review. *Aust. J. Basic Appl. Sci, 10*, 117-127.

(Reddy et al., 2014).

RHATTA M., DOUIRA A., et ZIDANE1 L., (2016). Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif occidental du Maroc), Journal of Applied Biosciences 97 :9187 – 9211, p 9188
RICHARD et al., 1985.

Richard H, (1992). Epices et aromates. *Edition Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 339p.*

Références bibliographiques

Rota M.C., Carramiñana J.J., Burillo J., Herrera A, (2004). In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67, 1252-1256p.

Roux D.et Catier O. (2007). Botanique, pharmacognosie, phytothérapie : Wolters Kluwer France, 146.

S

Sallé J.-L, (2004). Les huiles essentielles, Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. *2ème édition, Frison Roche*, 168p.

Sanago R., (2006). Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako (Mali) : 53.

Sipailiene A., Venskutonis, P.R., Baranauskiene, R. et Sarkinas, A., (2006). Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and majoral oils. *Journal of Essential Oils. Research*, vol 18p698-703.

Seraphin J.C.and Ferri P.H. (2005). Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 275- 285.

Skocibusic, M., Bezic, N., & Dunkic, V. (2006). Phytochemical composition and antimicrobial activities of essential oils from *Satureja subspicata* Vis. Growing in Croatia. *Food Chemistry*, 96, 20–28.

Stahl-Biskup E., Sáez F, (2002). Thyme: The genus *Thymus*. CRC Press, 346p

Saidj, F., Extraction des essences du thymus numedius kabylliica. (2007). Université M'hamed Bougara de Boumerdès.

Swanson, K.M.S., Busta, F.F., Peterson, E.H., Johanson, M.G., (1992). Colony count methods. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Food*, third ed. American Public Health Association, Washington, pp. 75–95.

Références bibliographiques

T

Teuscher, E., Anton, R., & Lobstein, A. (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 521.

Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231-R1249.

V

Valnet J. (2000). Aromathérapie. Ed. Maloine S. A.alteration of *saccharomyces cerevisiae*. *Phytother. Res.* 19(5), 405-8.

Z

Zhiri A, (2006). Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News Science, Nutrition, Prévention et santé.* Edité par la Fondation pour le libre choix, 12, 8p.

ZRIRA S., (2003). marché des plantes aromatiques des plantes aromatiques et médicinales au Maroc, cour, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B.P. 6202, Rabat Instituts, Rabat, p 2-3.

Références bibliographiques

Les annexes

Liste des abréviations

HE : Huile essentielle

CMI : concentration minimale inhibitrice

MBC : concentration minimale de bactéricide

M-H : Muller Hinton **NaCl**

: chlorure de sodium **µl** :

Microlitre **mm** : millimètre

Vol : volume

% : Pourcentage

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	<i>Thymus vulgaris</i> (Teuscher et al., 2005)	7
02	Aspect morphologique de <i>Thymus vulgaris</i> L. (Iserin, 2001).	8
03	la distribution géographique de thym dans le monde (Le cercle noir représente la zone de distribution du genre <i>Thymus</i> dans le monde) (STAHL-BISKUP et SAEZ, 2002).	9
04	Schéma de distillation des huiles essentielles à échelle industrielle par Entraînement à la vapeur d'eau. (Bassereau et al., 2007)	16
05	Schéma du principe de la technique d'hydro distillation (Rassem, 2016)	16

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Classification taxonomique de <i>Thymus vulgaris</i> (Goetz et Ghédira, 2012)	8
02	Localisation de quelques espèces de genre <i>Thymus</i> en Algérie	10
03	souches bactériennes utilisées	22
04	organisme d'essai obtenu auprès de l'université de Mossoul Iraq	23
05	Zones d'inhibition de la croissance (mm) montrant une activité antibactérienne pour l'huile végétale de <i>thymus vulgaris</i> obtenue de la région de Murcie ; diamètre du disque 6,0 mm	27
06	la Concentration minimale inhibitrice (MIC) et concentration minimale de bactéricide (MBC) (ul/mL) de l'huile végétales de <i>thymus vulgaris</i> obtenue de la région de Murcie	28
07	les principaux composants chimiques de l'huile essentielle de <i>thymus vulgaris</i>	29
08	Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>thymus vulgaris</i> obtenue de la région d'Iraq	29
09	activité antibactérienne de l'extrait de méthanol de <i>thymus vulgaris</i> obtenue de la région d'Iraq	30

