

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**Faci Elhadja**

**Mennad Rahma**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN ENSCIENCES BIOLOGIQUES**

**Spécialité:** Microbiologie Fondamentale

THÈME

L'activité antimicrobienne et antioxydant de la plante  
*Thymus vulgaris* de la région de Sidi Ali sur les  
microorganismes pathogènes

DEVANT LE JURY

<b>Président</b>	Mr. MEKHALDI Abdelkader	Pr	<b>U. Mostaganem</b>
<b>Encadreur</b>	Mme BELHADJI Amel	MCB	<b>U. Mostaganem</b>
<b>Examineur</b>	Mme CHOUGRANI Fadila	Pr	<b>U. Mostaganem</b>
<b>Co- encadreur</b>	Melle KEDDAR Fayza	Doctorante	<b>U. Chlef</b>

*Année universitaire 2021 / 2022*

## **Dédicace**

*Avec l'aide d'Allah le tout puissant, ce travail est achevé.*

*Je le dédie à toutes personnes qui me sont chère ;*

*Au deux être les plus chers au monde qui ont donnés sens à mon existence, et qui m'ont*

*Soutenu nuits et jours durant tout mon parcours.*

*Ma très chère mère **Nabai** qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, je lui serai éternellement*

*Reconnaissante, merci maman.*

*Mon très cher père **Hadj** qui m'a donné un magnifique modèle de volonté, merci papa, Avec*

*Mes prières qu'ils soient toujours en bonne santé.*

*A mes très chers frères et leurs enfants : **Soumai et Fatima**. A mes très chères sœurs*

*en particulier **Ibtissam et Hakima***

*A mon Compagnon de Derby **Amel** et ma binôme **Hadjja***

*A ma cousine **Sanusi Agbebi**, mon ami **Hakim Addou** et mon collègue **youssefi Abdelatif**.*

*En fin je dédie à toute la famille **Mennad** et tous ceux qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours d'études*

**Rahma M**



*Dédicace*

*Avant tout c'est grâce à notre Dieu que je suis arrivée à ce stade.*

*A la fontaine qui ne se lasse pas de donner à celle qui a tissé mon bonheur avec les fils tissés de cœur, qui a été présente quand j'en avais besoin, son attention et ses sacrifices encouragements, à ma chère mère ( **ELKHLA** ).*

*A ceux qui m'ont cherché et misérable pour jouir du confort et du contentement, qui n'ont rien lésiné pour me pousser sur le chemin du succès, qui m'ont appris à gravir les échelons de la vie avec sagesse et patience jusqu'à mon cher père ( **LAID** ).*

*A mes grands parents*

*À mes chères frères **Khaled, Nasr El-Din, Khair El-Din** et ma chère sœur **Hanan** qui m'ont soutenu.*

*Et aussi à mes chères amies **Souad, Aicha, Warda, Najat, Hamida** et mon binôme **Rahma**.  
*A mon collègue **Yousfi Abdelatif**.**

*Et à la fin, je souhaite à toutes mes proches santés, bien-être, bonheur et réussite*



## *Remerciements*

*Nous tenons tout d'abord à remercier le bon Dieu tout puissant de nous avoir aidé réaliser ce modeste travail.*

*Nous remercions très chaleureusement notre encadreur  
**Madame BELHADJI AMEL et Melle KEDDAR FAYZA co-encadreur.**  
qui nous ont encadrées, orientées, aidées et conseillées.*

*Tous nos remerciements à notre chef de parcours **Mr BAHRI. F**  
et notre gratitude aux membres du jury **Mme CHOUGRANI .F et**  
**Mr MEKHALDI** d'avoir accepté d'examiner ce travail*

*Nous remercions tous les enseignants de notre cursus universitaire qui ont  
contribué à notre formation ainsi que tous ceux qui ont contribué  
de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes  
L'expression de nos sincères remerciements.*

## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Classification botanique de Thymus.	3
2	Localisation des principales espèces de thym en Algérie.	5
3	Les caractéristiques des souches bactériennes.	21
4	Les valeurs des diamètres de la zone d'inhibition des l'huile essentielle et de l'extrait de <i>T. vulgaris</i> aux dix souches bactériennes.	27
5	Les valeurs des diamètres de la zone d'inhibition des l'huile essentielles et de l'extrait de <i>T.vulgaris</i> aux dix souches bactériennes.	28
6	Concentration minimal inhibitrice de l'extrait phénolique et l'huile essentielle de <i>T.vulgaris</i> .	33
7	Concentration minimal bactéricide CMB des extraits (polyphénols et l'huile essentielle).	36
8	Concentration minimal inhibitrice (mg/ml) et concentration minimal bactéricide (mg/ml) des extraits de <i>Thymus vulgaris</i> .	39
9	L'activité oxydant de polyphénols de feuilles de <i>T.vulgaris</i> .	40

## Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Aspects morphologique de <i>T.vulgaris</i>	4
02	Distribution géographique du thym dans le monde	5
03	La région de récolte de la plante ( <i>T.vulgaris</i> )	20
04	Filtration	22
05	Rota vapor	22
06	Extraction d'huiles essentielles	23
07	Diagramme de l'efficacité d'extraction de <i>T.vulgaris</i>	27
08	Les zones d'inhibition de l'huile essentielle de thym qui testé sur les souches référencées	30
09	Activité antimicrobienne de l'extrait d'huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> sur des souches bactériennes clinique	31
10	Activité antimicrobienne de l'extrait phénolique de <i>Thymus vulgaris</i> sur des souches bactériennes référencé et clinique	32
11	Résultat CMI d'extrait phénolique <i>T.vulgaris</i> sur les souches référencées et clinique	34
12	Résultat CMI d'extrait d'huile essentiel <i>T.vulgaris</i> sur les souches référencées et clinique	35
13	Détermination de CMB de l'extrait de l'huile essentielle de <i>T.vulgaris</i> sur les souches référencé et clinique	37
14	Détermination de la concentration minimale bactéricide de l'extrait phénolique de <i>T.vulgaris</i> sur les souches référencé et clinique	38
15	Pourcentage d'inhibition de radical DPPH en fonction des concentrations d'extrait phénolique	40
16	Propretés antioxydants de l'extraction phénolique de <i>T.vulgaris</i>	41

**Liste des abréviations :**

**ATCC:** American Type Culture Collection.

**BN :** Bouillon Nutritif

**CMI :** Concentration Minimale Inhibitrice.

**CMB :** concentration Minimale Bactéricide.

**°C :** Degré Celsius.

**Ca :** *Candida albicans*.

**DMSO:** Dimethyl sulfoxyde.

**DO :** Densité Optique.

**DPPH :** 2,2 – diphényl – 1 – picrylhydrazul.

**Ec :** *Escherichia coli*.

**GN :** Gélose Nutritif.

**g :** gramme.

**H .E :** Huile Essentielle.

**m:** masse.

**min :** minute.

**ml :** millilitre.

**mg :** milligramme.

**MH:** Muller Hinton.

**nm :** nanomètre.

**Pa :** *Pseudomonase airogenosa*.

**PM :** *Proteus mirabilis*.

**KP :** *Klepsila pneumonie*.

**Sa :** *Staphylococcice auriese*.

**TTC :** chlorure de 2-3-5-triphényl-2H-tétrazolium.

**T .vulgaris :** *Thymus vulgaris*.

**Ul :** microlitre.

**UFC :** unité formant colonie.

# Sommaire

Dédicace	
Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction .....	1
<b>PARTIE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>CHAPITRE I : La plante de <i>Thymus Vulgaris</i></b>	
I. Définition .....	3
II. Historique .....	3
III. Classification .....	3
IV. Description botanique .....	3
V. Répartition géographique de <i>thymus</i> .....	4
V.1. Dans le monde .....	4
V.2. Algérie .....	5
VI. Habitat et culture .....	6
VII. Les composés chimiques .....	6
VII.1. Huile essentielle .....	6
VII.2. Phénols totaux .....	6
VII.3. Flavonoïdes .....	7
VII.4. Vitamines .....	7
VII.5. Monoterpènes .....	7
VIII. Propriétés et usages .....	7
<b>CHAPITRE II : Les métabolites secondaires et l'activité biologique de thym</b>	
I. Généralités .....	9
II. Les composés phénoliques .....	9
II 1. Les acides phénoliques .....	9
II.2. Les flavonoïdes .....	10
II.2.1 Structure des flavonoïdes .....	10
II.3. Alcaloïdes .....	11
II.4. Les terpènes .....	11
III. Utilisation et activités biologiques de <i>Thymus vulgaris</i> .....	12
<b>CHAPITRE III : les bactéries pathogènes et activité antibactérienne</b>	
I. Introduction .....	14
II. Les bactéries pathogènes .....	14
II.1. <i>Escherichia coli</i> .....	15
II.1.1. Définition .....	15
II.1.2. Pouvoir pathogène .....	15
II.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	15
II.2.1. Définition .....	15
II.2.2. Pouvoir pathogène .....	16
II.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
II.3.1. Définition .....	16
II.3.2. Pouvoir pathogène .....	16
II.4. <i>Candida albicans</i> .....	16
II.4.1. Définition .....	16



II.4.2. Pouvoir pathogène .....	17
II.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	17
II.5.1. Définition.....	17
II.5.2. Pouvoir pathogène .....	17
II.6. <i>Proteus mirabilis</i> .....	17
II.6.1. Définition.....	17
II.6.2. Pouvoir pathogène .....	18
III. Activité antibactérienne.....	18

## PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

### CHAPITRE I : Matériel et Méthodes

I. Objectif .....	20
II. Matériel et Méthode.....	20
II.1. Matériel.....	20
II.1.1. Matériel biologique.....	20
II.1.1.1. La plante .....	20
II.1.1.2. Les souches utilisées.....	21
II.1.2. Matériel non biologique.....	21
II.3. Extraction.....	21
II.3.1. Extraction des polyphénols par méthanol pure.....	21
II.3.2. Rendement de polyphénol .....	22
II.3.3. Extraction des huiles essentielles.....	22
II.3.3.1. Dispositif d'extraction .....	22
II.3.4. Rendement des huiles essentielles .....	23
III. L'étude d'activité antimicrobienne.....	23
III.1. Méthode de détermination de l'activité antimicrobienne des extraits étudiés.....	23
III.1.1. Etude de l'aromatogramme (par les disques) .....	24
III.1.1.1. Principe.....	24
III.1.1.2. Procédure.....	24
III.1.1.3. Détermination de la sensibilité .....	24
III.1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	24
III.1.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) .....	25
IV. Étude d'activité antioxydant .....	25
IV.1. Méthode de piégeage des radicaux libres ,2diphényl-1-picryl hydrazyl (DPPH°) .....	25

### CHAPIETRE II : Résultats et discussion

I. Le rendement de l'extraction .....	27
II. Evaluation d'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et l'extrait de <i>T. vulgaris</i> .....	28
II.1. L'aromatogramme. ....	28
II.2. Concentration minimal inhibitrice .....	33
II.3. Concentration Minimal Bactéricide (CMB) .....	36
III. Résultat du test anti radicalaire au DPPH.....	39
IV. Détermination de l'IC50 (Concentration inhibitrice 50%) .....	41
Conclusion.....	44
Références .....	45

Annexes

Résumé

Abstract

ملخص

## Résumé

Le thym est un arbrisseau appartenant à la famille des *Lamiaceae*. Ce travail a porté sur l'étude de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et l'extrait phénolique de *Thymus vulgaris*.

L'extraction de l'huile essentielle est réalisée par hydrodistillation et l'extraction des phénols par macération. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur dix souches, selon la méthode des disques et la détermination des CMI par la méthode des micro dilutions sur les microplaques à 96puits suivie par l'étude de l'activité antioxydant par DPPH. Le rendement de l'huile essentielle et de l'extrait phénolique obtenu est de 0,39 % et 26,5% respectivement. Les résultats montrent que l'extrait du *T.vulgaris* possède une forte activité antimicrobienne représentée avec diamètres d'inhibition varient entre 7mm à 25mm pour l'extrait phénolique et avec un diamètre de 8mm à 37mm pour l'huile essentielle. La souche *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 était extrêmement sensible que les autres souches. Les concentrations minimales bactéricides (CMB) varient de 0,15mg/ml à 0,3mg/ml pour l'extrait phénolique et de 0,04mg/ml à 0,9mg/ml pour l'HE. Les résultats d'activité antioxydant d'extrait brut des feuilles de *T.vulgaris* ont révélé un pourcentage d'inhibition du DPPH très élevés de 83,50%.

**Mots clés :** *Thymus vulgaris*, polyphénols, huile essentielle, activité antimicrobienne, activité antioxydant.

## ملخص

يعتبر الزعتر شجيرة تنتمي إلى عائلة *Lamiaceae* ، وقد ركز هذا العمل على دراسة التأثير المضاد للميكروبات للزيت العطري والمستخلص الفينولي من *Thymus vulgaris*. يتم استخراج الزيت العطري عن طريق التوسيع المائي واستخراج الفينولات عن طريق النقع. تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات على عشر سلالات، وفقاً لطريقة القرص وتحديد MIC بطريقة microdilution على صفيحة 96 بئر. دراسة النشاط المضاد للأوكسدة بواسطة DPPH. عائد الزيت العطري والمستخلص الفينولي الذي تم الحصول عليه هو 0.39% و 26.5% على التوالي. أظهرت النتائج أن مستخلص *T. Vulgaris* له نشاط قوي مضاد للميكروبات ممثلة بأقطار تثبيط تتراوح بين 7 مم إلى 25 مم لمستخلص الفينول وقطر من 8 مم إلى 37 مم للزيت العطري. كانت سلالة المكورات العنقودية الذهبية ATTC 25923 شديدة الحساسية من السلالات الأخرى. تختلف تركيزات الحد الأدنى من مبيد الجراثيم (MBC) من 0.15 مجم / مل إلى 0.3 مجم / مل للمستخلص الفينولي ومن 0.04 مجم / مل إلى 0.9 مجم / مل للزيت العطري. أظهرت نتائج النشاط المضاد للأوكسدة للمستخلص الخام لأوراق *T. Vulgaris* نسبة عالية جداً من تثبيط DPPH بلغت 83.50%.

**الكلمات المفتاحية:** الغدة الصعترية ، البولي فينول ، الزيت العطري ، النشاط المضاد للميكروبات ، النشاط المضاد للأوكسدة.

## **Abstract**

Thym is a shrub belonging to the family Lamiaceae. This work focused on the study of the antimicrobial effect of the essential oil and phenolic extract of *Thymus vulgaris*. The extraction of the essential oil is carried out by hydrodistillation and the extraction of phenols by maceration. The antimicrobial activity was determined on ten strains, according to the disc method and the determination of MIC by the microdilution method on 96-well microplates. The study of antioxidant activity by DPPH. The yield of essential oil and phenolic extract obtained is 0.39% and 26.5% respectively. The results show that the extract of *T.vulgaris* has a strong antimicrobial activity represented with inhibition diameters vary between 7mm to 25mm for the phenolic extract and with a diameter of 8mm to 37mm for the essential oil. The *Staphylococcus aureus* strain ATTC 25923 was extremely sensitive than the other strains. The minimum bactericidal concentrations (MBC) ranged from 0.15mg/ml to 0.3mg/ml for the phenolic extract and from 0.04mg/ml to 0.9mg/ml for the EO. The results of antioxidant activity of crude extract of *T.vulgaris* leaves were revealed a very high percentage of DPPH inhibition of 83.50%.

**Key words:** *Thymus vulgaris*, polyphenols, essential oil, antimicrobial activity, antioxidant activity.

# *Introduction*



**Introduction :**

L'Algérie, la porte de l'Afrique, par son climat très varié (la mer méditerranéenne au Nord et le Sahara dans le sud) et sa situation géographique particulière bénéficie d'une flore très riche et diversifiée répartie sur tout son territoire. En effet, le Nord algérien présente une large gamme des espèces endémiques adaptées au climat de la zone et appartiennent aux différentes familles entre autre : les Lamiaceae, les Asteraceae, les Apiaceae, etc. Ces plantes endémiques constituent un important réservoir de substances actives ce qui peut conduire à la découverte de nouveaux agents antimicrobiens ou molécules d'intérêts scientifiques (Zenasni, 2014).

La famille des Lamiacées est l'une des plus répandues dans le règne végétal (Naghbi *et al*, 2005). C'est une famille d'une grande importance aussi bien pour son utilisation en industrie alimentaire et en parfumerie qu'en thérapeutique. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extrait à fort pouvoir antibactérien, antifongique , anti inflammatoire et antioxydant (Gherman *et al* ., 2000 ;Bouhdib *et al* ., 2006 ;Hilan *et al* .,2006).

La famille Lamiacées est contient des plusieurs espèces et d'eux le thym (*Thymus*). Le thym est l'une des plantes les plus utilisées comme épices et extraits à fort pouvoir antibactérien et anti inflammatoire dans la pharmacopée traditionnelle. En effet, le thym « zaatar » est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, en décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et gastrites, en usage externe comme cicatrisants et antiseptiques. Les feuilles de thym sont riches en huile essentielle dont les propriétés mises à profit en phytothérapie (Bellakhdar, 1997 ; Ebrahimi ,2008).

Dans le cadre de la valorisation des plantes algériennes, et compte tenu des vertus thérapeutiques que représentent les Lamiacées, cette étude est portée sur l'espèce (*Thymus vulgaris*). *Thymus vulgaris* est largement utilisé comme antitussif, antispasmodique, antibroncholitique, propriétés anthelminthinsues, carminatives et diurétiques. Les espèces Iranien et Turques du *Thymus* ont été respectivement déclarées pour leur activité antibactérienne ( Bayati .2008).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche et de l'exploitation de substances bioactives telles que les substances naturelles à activité antibactérienne. L'objectif de ce travail est d'évaluer in vitro l'activité antimicrobienne d'extraits de feuilles de *Thymus Vulgaris* contre des souches pathogènes provoquant des infections des voies urinaires. Il s'agira également de caractériser les groupements chimiques permettant d'expliquer les effets thérapeutiques après avoir fait une extraction des composés phénoliques et l'huile essentielle de *Thymus Vulgaris*.

Ce manuscrit est divisé en deux parties, la première représente une synthèse bibliographique, elle comprend trois chapitres, le premier décrit la plante (*Thymus vulgaris*), le deuxième traite les métabolites secondaires et les activités biologiques, le troisième est réservé aux bactéries pathogènes et les activités antibactériennes. La deuxième partie est consacrée aux matériels et méthode ainsi que les résultats et discussion. Enfin le manuscrit est conclu par une conclusion générale.



# *Synthèse Bibliographique*

# **Chapitre I**

## ***La plante de Thymus Vulgaris***

## I. Définition

Le thym est une plantes aromatiques les plus employés en thérapeutique depuis les temps les plus anciens. Il a toujours accompagné la vie quotidienne des humains, tant pour ses usages médicaux et cosmétiques que culinaires. (Boukhatem *et al*, 2014)

## II. Historique

Le nom «Thym» provient du mot Grec «Thymos» qui veut dire odeur, et à ce titre le Thym est très largement utilisé en qualité de plante aromatique, en particulier dans la cuisine méditerranéenne en tant que condiment (Richard, 1985).

Les Romains, la diffusant en Europe, en faisaient de nombreuses sortes de cosmétiques (eau de toilette parfumant même leurs couches, baume censé retarder le vieillissement) et s'en servaient pour purifier leurs pièces d'habitation et pour « donner du parfum aux fromages et liqueurs.» (Grieve, 1931).

## III. Classification

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure (Morales, 2002) synthétisée dans le tableau 1.

**Tableau 01** : Classification botanique de Thymus

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Labiales
Famille	Lamiacées
Genre	Thymus

## IV. Description botaniques

*Thymus vulgaris* est un sous –arbrisseau touffu, vivace et aromatique pouvant atteindre de 20 à 30 cm de hauteur, Ses tiges sont dressées, ligneuses, rameuses et tortueuses à la base et ses racines sont assez robustes, ses branches sont minces, denses, ramifiées, blanchâtres et courtement velues, portant des feuilles persistantes de couleur vert grisâtre, sub-sessiles, opposées, oblongues-lancéolées à linéaires et mesurant de 3 à 12mm de long et de 0.5 à 3mm de large.

Les marges de leurs limbes sont enroulées sur la face ventrale ce qui donne aux feuilles une forme générale d'aiguille. Les fleurs sont de petite taille (4 à 6mm de long), de couleur blanche à rose, bilabées, zygomorphes, regroupées par 2 ou 3 à l'aisselle des feuilles et rassemblées en glomérules ovoïdes (figure 01). La période de floraison de l'espèce dans la période mai à août (Prasanth *et al*, 2014).

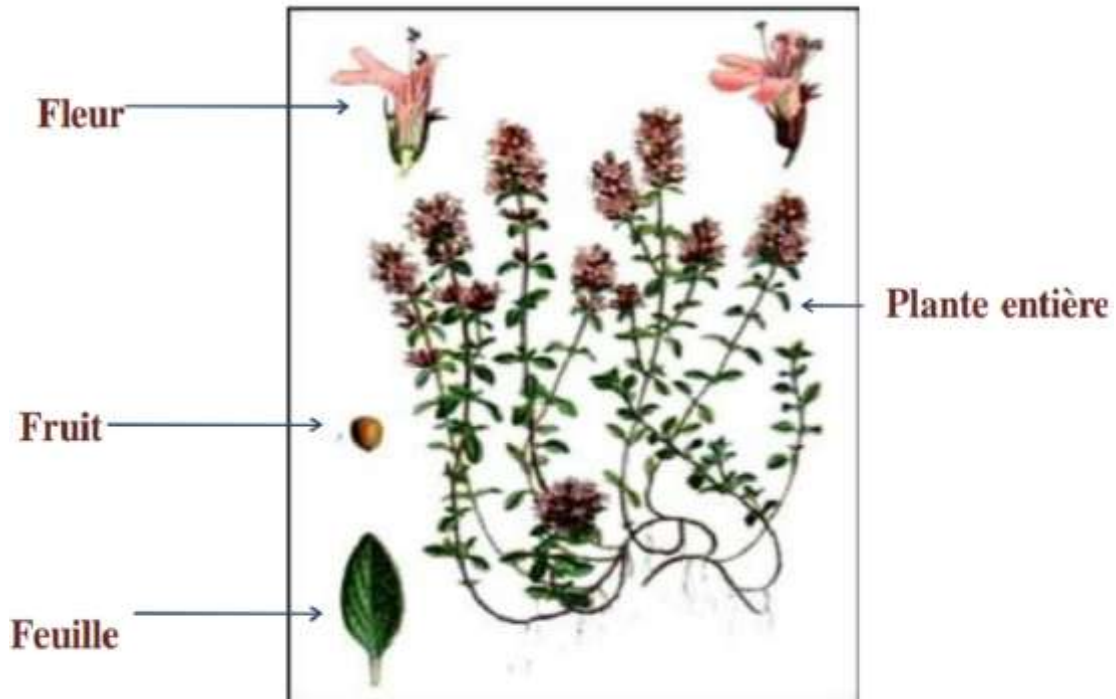
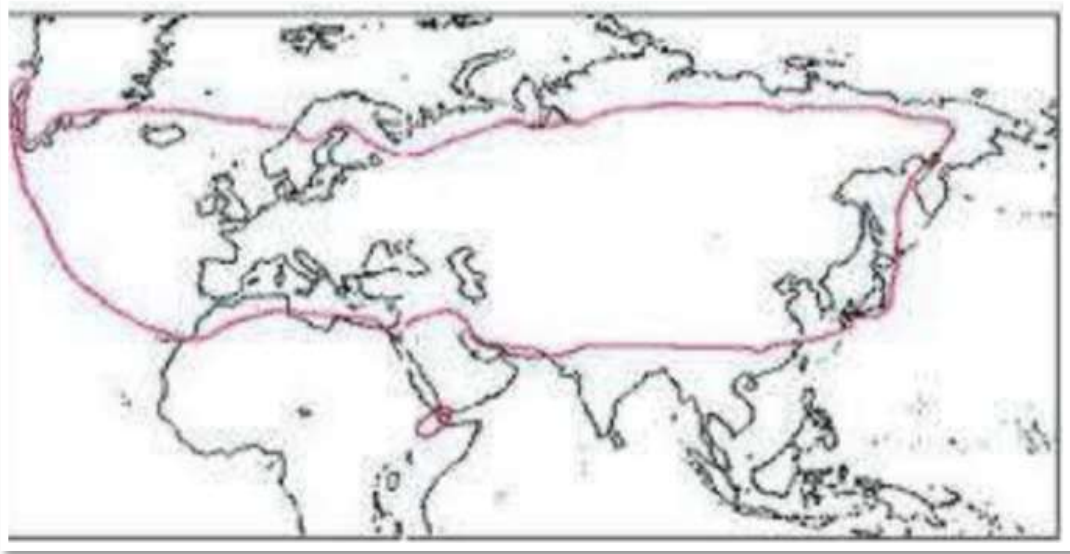


Figure 01 : Aspects morphologique de *T.vulgaris* (Iserin ,2001)

## V. Répartition géographique de *Thymus*

### V.1.Dans le monde

Le thym est réparti entre l'Europe, l'Asie occidentale et la Méditerranée. En Afrique du Nord-Ouest (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye), en Éthiopie et Du sud-ouest de l'Arabie à la Péninsule du Sinaï en Égypte. Aussi trouvé Dans la région de Macalonia (îles Canaries, Madère Et Açores) et de l'Himalaya. Il peut même Atteignez la frontière entre les régions tropicales et Le Japon. Au nord, il pousse en Sibérie, Europe du Nord jusqu'aux confins du Groenland (Abdelli, 2017).



**Figure 02 :** Distribution géographique du thym dans le monde (Abdelli, 2017)

## V.2. Algérie

L'Algérie est célèbre pour sa superficie et son abondance de plantes médicinales et sa Diversité bioclimatique. Le thym est une plante largement répandue en Algérie. Différentes Espèces du nord de l'Algérie à l'Atlas du désert du Sahara, la zone est répartie sur tout le territoire Du pays, de Constantine à Oran (Touhami, 2017) .Tableau 2.

**Tableau 02:** Localisation des principales espèces de thym en Algérie (Touhami, 2017)

Espèces	Découverte par	Localisation	Nom local
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et Link	Rare dans la région de Tlemcen.	-
<i>T. fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérois.	-
<i>T. munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord Algérois.	Djertil
<i>T. commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran.	
<i>T. 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.	Tizaàt arte
<i>T. guyonii</i>	Noé	Rare dans le sous-secteur Des hauts plateaux algérois, oranais et Constantinois.	-
<i>T. lancéolatus</i>	Desfontaine	Rare dans : Le secteur de l'atlas tellien (Terni De Médéa BENCHICAO) et dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois, Oranais (Tiaret) et constantinois.	Zaàteur
<i>T. pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous-secteur de L'Atlas Saharien et constantinois	
<i>T. hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral.	
<i>T. glandulosus</i>	Lag	Très rare dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois	
<i>T. algeriensis</i>	Boiss et Reuter	Très commun dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois, oranais	Djertil Zaitra

## VI. Habitat et culture

*Thymus vulgaris* est une plante typique des garrigues, qui s'accommode particulièrement dans les zones calcaires et rocailleuses, ne dépassant pas 2500 m d'altitude (Pitman, 2004 ; polese, 2006). Elle préfère les sols légers, perméables, secs ou bien drainés, légèrement alcalins, constamment ensoleillés et quelque peu riches en matières organiques et en éléments minéraux fertilisants (Rey, 1999 ; Small et Deutsch, 2001 ; Peter, 2004).

Elle ne survit pas longtemps dans un sol lourd et détrempé. Sa croissance tolère un pH allant de 4.5 à 8.0 et pousse dans n'importe quel climat ayant une température moyenne annuelle de 7 à 20 °C (Small et Deutsch, 2000 ; Peter, 2004).

## VII. Les composés chimiques

### VII.1. Huile essentielle

La teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré (Bruneton, 1999) ; 30 composés ont été identifiés et caractérisés, les plus abondants sont respectivement : thymol (44,4-58,1 %), p-cymène (9,1-18,5 %),  $\gamma$ -terpinène (6,9-18,0 %), carvacrol (2,4-4,2 %), linalol (4,0–6,2 %). La caractéristique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée du thymol (Guillén *et al.*, 1998; Balladin *et al.*, 1999; Hudaib *et al.* 2002; Bouhdid *et al.* 2006).

### VII.2. Phénols totaux

Il est riche aussi en Acide rosmarinique, Acide caféique et Acide p-hydrox benzoïque (Kulišić *et al.* 2006).

### VII.3. Flavonoïdes

Parmi les flavonoïdes qui se trouve au *T.vulgaris* : Acacétine, Hispiduline, Cirsimaritine, Xanthomicrol, Scutellarine, Cirsilinéol, Thymonine, 8-méthoxycirsilinéol, Kampférol, Quercétine, Rutine (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

### VII.4. Vitamines

La composition en vitamines révèle la présence de la vitamine E (I-tocophérol) (4,4 mg/Kg) (Guillén et Manzanos, 1998).

### VII.5. Mono terpènes

La teneur en mono terpène (R)-p-cymen-9-yl beta-D-glucopyranoside, 2- $\beta$ -D-glucopyranosyl thymoquinols, 5- $\beta$ -D-glucopyranosyl thymoquinols, (-)-angelicoidenol-beta-D-glucopyranoside (Takeuchi *et al.*, 2004). Chez *Thymus vulgaris* de la Méditerranée occidentale on trouve sept chimiotypes différents (à thymol, à carvacrol, à géraniol, à linalol, à terpinéol, à trans-4-thuyanol, à cis-8-myrcénol et à cinéol) (Bruneton, 1999).

## VIII. Propriétés et usages

*T.vulgaris* est largement répandue dans la médecine traditionnelle dans les traitements des gastroentérites et les affections broncho-pulmonaires. Elle possède aussi de nombreuses activités biologiques, antiseptique, antispasmodique (Vanaclocha *et al.*, 2003), expectorant, diurétique, stomachique Vermifuge (Hmamouchi, 1999), antioxydant (Viuda-Martos *et al.*, 2010) et Antimicrobienne (Kon *et al.*, 2012).

Elle est utilisée pour le traitement des Parodontopathies (tuméfaction Gingivale) (77,7%), mauvaise haleine (63,1%) et saignement gingival (75,7%) (Guessous, 2013) et contre les maladies du système digestif, respiratoire et du Système cardio-vasculaire et les maladies rhumatologiques (Zeggwagh *et al*, 2013).

De plus, son huile essentielle est utilisée dans les industries alimentaires, Pharmaceutique et cosmétique (Jordan *et al*, 2006). L'épice *T.vulgaris* est intensivement cultivé en Europe et aux Etats-Unis Pour l'usage culinaire dans l'assaisonnement des poissons, volailles, des potages et Des légumes (Özcan *et al*, 2004).



## **Chapitre II**

### ***Les métabolites secondaires et l'activité biologique de thym***

## I. Généralités

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, des synthèses de composés analogues (métabolites secondaires) ont commencés à naître ; et afin d'augmenter leurs efficacités pharmacologiques, des études des structures et des activités biologiques issues des dérivés phényles de ces métabolites ont été réalisés. Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures.

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, et ont des intérêts multiples. Ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires.

La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles ou des matières premières pour la héli synthèse de composés actifs.

Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés anti oxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes (Epifano *et al*, 2007).

## II. Les composés phénoliques

Le terme « polyphénols » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant Plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les mono phénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale « composés phénoliques » Concerne à la fois les mono, les di et les poly phénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (Fleuriet, 2005).

### II.1. Les acides phénoliques

On distingue deux principales classes des acides phénoliques (Nagendran, 2006) :

- **Les dérivés de l'acide benzoïque (Les hydroxybenzoïques) :** qui inclus plusieurs molécules dont les plus fréquentes sont ; L'acide gallique, l'acide Vanillique, l'acide syringique et le p-hydroxybenzoïque. Ces composants ont une Structure de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> en commun.

- **Les dérivés de l'acide cinnamique (Les hydroxycinnamiques) :** Ces Molécules possèdent un cycle aromatique avec 3 carbones en plus C<sub>6</sub>- C<sub>3</sub> ; comme L'acide caféique,

l'acide férulique, p-coumarique et l'acide sinapique. La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez Les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux des acides hydroxycinnamiques sont très présents (Fleuriet *et al*, 2005).

## **II.2. Les flavonoïdes**

Des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur des fleurs, des fruits et des feuilles (Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005).

### **II.2.1 .Structure des flavonoïdes**

Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituant portés sur le cycle (Pietta, 2000). Les plus répandus et les mieux caractérisés sont: flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols et anthocyanidines (Heim *et al*, 2002 ; Hendrich, 2006).

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie des flavonoïdes autre que le sucre est appelée aglycone ou génine, l'unité glycosidique la plus commune est le glucose mais parfois elle peut être glucorhamnose, galactose, arabinose ou rhamnus (Heim *et al*, 2002).

La méthodologie habituelle pour étudier les dérivés flavonoidiques dans les plantes implique les extractions successives employant plus d'un solvant, plusieurs étapes de fractionnement et différentes techniques de chromatographie pour extraire, séparer, isoler, épurer et identifier les composés d'intérêt.

De nombreuses études ont confirmé que les espèces qui appartiennent à la famille des Lamiaceae sont une bonne source d'acide rosmarinique, l'identification des composés polyphénoliques dans l'infusion aqueuse de *T.vulgaris* par analyse HPLC a montré une présence dominante d'acide rosmarinique (17,45 mg/g = 1,7 % de la masse sèche de *T. vulgaris*) et un autre composé significatif est l'eriocitrin (1,96mg/g) (Kulišič *et al*, 2006).

D'autres composants ont été détectés seulement en traces, l'acide caféique (0,02 mg/g) et l'acide *p*-hydroxybenzoïque. La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence de la vitamine E (I-tocophérol) (4,4 mg/Kg) (Guillén *et al*, 1998; Kulišič *et al*, 2006).

### II.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont d'origine naturelle, le plus souvent végétale. Ce sont des substances organiques azotés et basiques, doués, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées. A l'état naturel, ils sont généralement salifiés par les acides organiques ou combinés à des tanins (Bruneton, 2009).

On peut les subdiviser en trois classes : Alcaloïdes vrais, protoalcaloïdes et pseudo alcaloïdes.

- **Alcaloïdes vrais** : ils se caractérisent par une importante cytotoxicité, expose une vaste activité physiologique, la plupart sont des bases stables, elle comporte un ou plusieurs atomes d'azotes dans le cycle.
- **Protoalcaloïdes** : se sont des amines simples comme les acides aminés et d'autre Alcaloïdes.
- **Pseudo alcaloïdes** : regroupe les composés azotés, non dérivés des acides aminés ; l'incorporation de l'azote dans la structure se fait en phase finale ; comme la caféine (Hårborne *et al*, 1969).

### II.4. Les terpènes

Les terpènes forment une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ce sont des composants majeurs de la résine et de l'essence de térébenthine produite à partir de résine.

Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène  $C_5H_8$  et ont pour formule de base des multiples de celle-ci ( $C_5H_8$ ). On peut considérer l'isoprène comme l'un des éléments de construction préférés de la nature. Leur squelette de carbone est constitué d'unités isopréniques reliées entre eux. C'est ce que l'on appelle la règle de l'isoprène.

Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles. En fonction du nombre  $n$  (entier) d'unités, on peut distinguer pour;  $n = 2$  : les monoterpènes ( $C_{10}$ ),  $n = 3$ : les sesquiterpènes ( $C_{15}$ ),  $n = 4$ : les diterpènes ( $C_{20}$ ),  $n = 5$ : les sesterpènes ( $C_{25}$ ),  $n = 6$ : les triterpènes ( $C_{30}$ ) (Soldermann, 2002).

Le carotène est un tétraterpène ( $C_{40}H_{64}$ ), Il joue le rôle de pigment en photosynthèse végétale. Des matières aussi diverses que le caoutchouc, la vitamine A1 ou le cholestérol sont construites essentiellement des «briques» d'isoprènes. Parmi les terpènes les plus importants on trouve: l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène, le  $\delta$ -3- carène, le limonène, le carotène...

En revanche, les caroténoïdes qui contiennent des atomes d'oxygènes, ne sont pas à Proprement parler des terpènes, mais des terpénoïdes (luteine). Deux propriétés fondamentales

de terpènes sont leurs caractères odoriférants (Géranium) et leurs sensibilités à la lumière. Un grand nombre d'entre eux possède des Propriétés antiseptiques (Klaas *et al.* 2002).

### **III. Utilisation et activités biologiques de *Thymus vulgaris***

*T.vulgaris* est une des plantes aromatiques les plus populaires utilisées dans le monde. Il est vastement appliqué et touche particulièrement le domaine alimentaire et celui de la médecine traditionnelle (Adwanet *et al.*, 2006).

L'huile essentielle de cette plante est exploitée en aromathérapie et dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Tisserand, 2014). Elle entre dans la composition de divers produits pharmaceutiques tels que : les pommades antiseptiques et cicatrisantes, les émulsions, les cataplasmes, ainsi que, les gouttes, les sirops, les élixirs ou les gélules pour le traitement des affections des voies respiratoires ainsi que des préparations pour inhalation (Tiwari *et al.*, 2004 ; Zarzuelo *et al.*, 2002).

En raison de ses nombreuses propriétés ethno médicinales, *T. vulgaris* est utilisé comme stimulant, antiseptique, sédatif, stomatique, antitussif, antispasmodique, antimicrobien, antioxydant, anti-inflammatoire, antiviral, carminatif, expectorant, diaphorétique et diurétique (Johnson, 1998 ; Razzaghi *et al.*, 2013).

## **Chapitre III**

### ***Les bactéries pathogènes et l'activité antibactérienne***

### I. Introduction

Les bactéries sont très nombreuses et ont souvent été considérées comme des agents pathogènes et agressifs responsables de maladies plus ou moins graves. Mais, contrairement au virus, ce n'est pas toujours le cas .....En effet, le corps humain est colonisé par de nombreuses bactéries qui constituent la « flore commensale » (Heart et Atlas ,2006).

Par exemple, au niveau du système digestif, le microbiote intestinal, largement impliqué dans les processus de digestion et de défense de l'organisme, est composé d'environ mille milliards de bactéries. Certaines de ces bactéries sont utilisées dans l'alimentation ou dans certains médicaments pour rééquilibrer le microbiote et rétablir une fonction digestive normale (Goulet ,2009).

### II. Les bactéries pathogènes

Les bactéries pathogènes sont des bactéries qui peuvent causer des maladies (Ryan *et al*, 2014). La plupart des espèces de bactéries sont inoffensives et souvent bénéfiques, mais d'autres peuvent causer des maladies infectieuses (McFall-Ngai *et al*, 2007).

Le nombre de ces espèces pathogènes chez l'homme est estimé à moins d'une centaine (En revanche, plusieurs milliers d'espèces font partie de la flore intestinale présente dans le tube digestif).

Les bactéries pathogènes sont spécialement adaptées et dotées de mécanismes pour surmonter les défenses normales de l'organisme et peuvent envahir des parties du corps, telles que le sang, où les bactéries ne se trouvent normalement pas. Certains agents pathogènes n'envahissent que l'épithélium de surface, la peau ou les muqueuses, mais beaucoup voyagent plus profondément, se propageant à travers les tissus et se disséminant par les voies lymphatique et sanguine. Dans de rares cas, un microbe pathogène peut infecter une personne en parfaite santé, mais l'infection ne se produit généralement que si les mécanismes de défense de l'organisme sont endommagés par un traumatisme local ou une maladie débilitante sous-jacente, telle qu'une blessure, une intoxication, un refroidissement, une fatigue et une malnutrition. Dans de nombreux cas, il est important de différencier infection et colonisation, c'est-à-dire lorsque les bactéries causent peu ou pas de dommages.

Les bactéries pathogènes provoquent également des infections telles que le tétanos, la fièvre typhoïde, la diphtérie, la syphilis et la lèpre. Elles sont également à l'origine de taux élevés de mortalité infantile dans les pays en développement (Santosham *et al*, 2013).

La plupart des bactéries pathogènes peuvent être cultivées dans des cultures et identifiées par la coloration de Gram et d'autres méthodes. Les bactéries cultivées de cette manière sont

souvent testées pour trouver quels antibiotiques seront un traitement efficace contre l'infection. Pour les agents pathogènes jusqu'ici inconnus, les postulats de Koch sont la norme pour établir une relation causale entre un microbe et une maladie (Azoulay, 2020).

## **II.1. *Escherichia coli***

### **II.1.1. Définition**

*Escherichia coli* (colibacille) est une entérobactérie mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole. *E. coli* est un commensal du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Il représente à lui seul la plus grande partie de la flore bactérienne aérobie de l'intestin (espèce aérobie dominante) à raison de 10<sup>8</sup> par gramme de fèces (flore totale : 10<sup>11</sup> à 10<sup>12</sup> bactéries par gramme). *E. coli* est un bacille à Gram négative, disposée séparément ou par paires. Il est mobile par les flagelles péritriches, bien que certaines souches ne soient pas mobiles. Des capsules et des fimbriae se trouvent dans certaines souches. La température de croissance optimale est de 37 ° C. Sur la gélose nutritive, leur croissance donne des colonies, blanc grisâtre, humilées, lisses, opaques ou translucides (Toma *et al* ,2003).

### **II.1.2. Pouvoir pathogène**

Son réservoir naturel est l'homme et tous les animaux à sang chaud. *E. coli* fait partie de la flore commensale. Il représente 80% de la flore intestinale aérobie de l'adulte, et on le retrouve aussi au niveau de différentes muqueuses.

De simple bactérie commensale, *E. coli* peut aussi devenir un agent pathogène responsable de différents types d'infections ; infections urinaires, diarrhées cholécystites.

Il peut aussi être impliqué dans des infections nosocomiales. La transmission peut se faire par contact direct ou via des contaminations fécales (Flandrois, 2000).

## **II.2. *Staphylococcus aureus***

### **II.2.1. Définition**

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des cocci à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappe de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative. Il existe 27 espèces du genre *Staphylococcus* actuellement répertoriées, dont *S.aureus* est la principale (Demetrio *et al* ,2016).

*S. aureus* est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino-pharynx, intestin). On le retrouve sur la muqueuse nasale d'un tiers environ des sujets normaux. Éliminé dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans



l'environnement. L'apparence microscopique du *S. aureus* est ronde et ressemble à celle d'une sphère (cocci). En raison de la manière dont les bactéries se divisent et se multiplient, elles apparaîtront en grappes ou en tétrades. (Van cleef *et al*, 2011).

### **II.2.2. Pouvoir pathogène**

Son réservoir naturel est l'homme. *S. aureus* est très fréquent à l'état commensal et pathogène. En effet, très rapidement après la naissance, il colonise la peau, le tube digestif et la région périnéale des nouveaux nés. Il est également très présent au niveau des fosses nasales et des mains.

Mais il peut devenir pathogène et être responsable d'infections cutanée. Et de certaines infections ORL. En milieu hospitalier, il est impliqué dans les infections nosocomiales, pouvant être graves. *S. aureus* peut aussi être responsable d'intoxications alimentaires. Il se transmet par les mains ou par voie oro-pharyngée, peut ainsi diffuser son mode épidémique dans les maternités, les écoles, les crèches. Pouvant survivre dans le milieu extérieur, il peut être retrouvé sur la literie, dans le matériel médical à l'hôpital, ce qui amplifie les phénomènes de transmission (Flandrois, 2000).

## **II.3. *Pseudomonas aeruginosa***

### **II.3.1. Définition**

*P. aeruginosa* appartient à la classe des  $\gamma$  *protéobactéries*. C'est un bâtonnet aérobie à Gram négatif appartenant à la famille *Pseudomonadaceae* dont le biotope est l'environnement (sol, eau). Cependant, il est aussi isolé à la surface des plantes et parfois à la surface des animaux.

### **II.3.2. Pouvoir pathogène**

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable des infections nosocomiales graves, d'infections potentiellement mortelles chez les patients atteints de mucoviscidose (Benhaj *et al*, 2011).

## **II.4. *Candida albicans***

### **II.4.1. Définition**

*Candida albicans* est un organisme vivant à l'état naturel dans les muqueuses de l'être humain. On le retrouve dans le tube digestif de 70% des adultes sains (Askin *et al*, 2015), et il

n'entraîne habituellement aucune maladie ou symptôme en particulier. C'est un organisme commensal saprophyte (Bennett *et al*, 2005).

#### **II.4.2. Pouvoir pathogène**

Les champignons pathogènes sont responsables d'infections généralisées et représentent un problème majeur de santé mondiale (Brown *et al*, 2012). Parmi les différentes espèces de champignons, *C. albicans* est impliqué dans plus de la moitié des candidoses et est toujours considéré comme un agent pathogène majeur. Cette levure est responsable d'infections des muqueuses gynécologique et digestive, qui peuvent évoluer en maladies systémiques. Cela concerne 0.3% des admissions hospitalières en France et 50% des patients touchés par ces infections généralisées en meurent (Leleu *et al*, 2002).

### **II.5. *Klebsiella pneumoniae***

#### **II.5.1. Définition**

*Klebsiella pneumoniae* est un hôte normal du tube digestif, mais en faible quantité, ne dépassent pas 5% de la flore aérobie. Sa résistance à toutes les pénicillines dégradables par les B-lactamases (pénicilline G, ampicilline et carbénicilline). Les bactéries du genre *Klebsiella* se distinguent par leur immobilité, leur regroupement en diplobacilles, généralement, en capsule (Pillet *et al*, 1986).

#### **II.5.2. Pouvoir pathogène**

*K. pneumoniae* détermine des infections respiratoires, des infections intestinales et urinaires. Elle a un effet cytotoxique sur les épithéliums des voies aériennes et peut être responsable d'infections nosocomiales.

*K. pneumoniae* est une souche hyper virulente issue d'Asie responsable d'infections foudroyantes. Elle touche particulièrement le système nerveux central et l'œil. Elle peut également être responsable d'abcès hépatiques. Le bilan d'extension et le traitement de cette infection ne font pas l'objet de recommandations et sont donc discutés au cas par cas (Thomas *et al*, 2019).

### **II.6. *Proteus mirabilis***

#### **II.6.1. Définition**

*P. mirabilis* est une bactérie Gram négative qui est bien connue pour sa capacité à essaimer de manière robuste sur les surfaces selon un motif en œil de bœuf saisissant. Cliniquement, cet

organisme est le plus souvent un pathogène des voies urinaires, en particulier chez les patients subissant un cathétérisme au long cours. *P. mirabilis* est bien connu dans les laboratoires cliniques et les cours d'enquête de microbiologie comme l'espèce qui essaime sur les surfaces de gélose, dépassant toute autre espèce présente dans le processus. (O'Hara, *et al*, 2000).

### **II.6.2. Pouvoir pathogène**

Provoquer des calculs rénaux. Cette bactérie est uréase positive et produit donc une uréase capable de transformer l'urée en ammoniacque, alcalinisant l'urine.

## **III. Activité antibactérienne**

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. (Haddouche *et al*, 2008) Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les microorganismes résistant aux antibiotiques.

Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des micro-organismes ou les plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles. (Sagdic *et al*, 2002). En particulier, l'activité antimicrobienne d'huiles et des extraits de plantes ont formé la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, médecine, thérapie naturelle et la conservation des aliments (Sagdic *et al*, 2002).

# *Partie Expérimentale*

# **Chapitre I**

## ***Matériel et méthodes***

## I. Objectif

Notre objectif de travail est d'évaluer l'activité antimicrobienne et antioxydante de *Thymus vulgaris*.

## II. Matériel et Méthode

### II.1.1. Matériel biologique

#### II.1.1.1. La plante

La plante *T. vulgaris* a été récoltée au mois de Mars 2022 dans la région de Ouled Maalah de l'ouest de Sidi Ali de la wilaya de Mostaganem, caractérisée par une Latitude 36°00'25'' Nord, une Longitude 0° 35'31'' Est et une Altitude de 44m (figure 03).



**Figure 3 :** La région de récolte de la plante *Thymus vulgaris*  
Zone de prélèvement de matériel végétal (thym). Données cartographie Google maps

Les feuilles de *Thymus vulgaris* ont été séchées à l'ombre, pendant trois semaines et broyées à l'aide d'un moulin électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine pour faciliter le contact de matière végétale et solvant d'extraction.

L'échantillon de la poudre des feuilles de *T. vulgaris*, récupéré après broyage et tamisage a été stocké dans un bocal en verre hermétiquement fermé, à l'abri de la lumière pour des analyses ultérieures.

#### II.1.1.2. Les souches utilisées

On a utilisé des souches référencées et des souches cliniques ont été récupérées au niveau du laboratoire d'hygiène de Mostaganem (Tableau 03)

**Tableau 03** : Les caractéristiques des souches bactériennes.

Nome de bactérie	Référence	Type
<i>Escherichia coli</i>	Clinique	Gram négatif
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gram négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 70603	Gram négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Clinique	Gram positif
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Gram positif
<i>Candida albicans</i>	Clinique	Levure
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10230	Levure
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinique	Gram négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Gram négatif
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 23659	Gram négatif

### II .1.2. Matériel non biologique

Pour réaliser cette étude, le matériel utilisé est composé d'un ensemble de réactifs, de produits chimiques, de verreries, d'appareillages et des milieux de culture (Annexe 01).

### II.3. Extractions

Dans cette étude on va faire deux extractions : extraction de polyphénol et extraction d'huile essentielle.

#### II.3.1. Extraction des polyphénols par méthanol pure

L'extraction a été réalisée selon la méthode Sujith *et al.* (2011). Un échantillon de 10g de matériel végétal (poudre de feuilles) broyé est mélangé à 100ml de méthanol. Le mélange a été maintenu dans un bain marie de 60°C pendant 20min avant d'être filtré figure 04 .Trois répétitions sont ainsi réalisées .Les trois filtrats ont été combinés et le solvant a été éliminé à l'aide d'un rotavapore à 40°C, Annexe 02 ; figure 05



Figure 04 : filtration



Figure 05 : Rota vapor

### II. 3.2. Rendement de polyphénol

Le rendement de l'extraction est déterminé par le rapport entre la masse de l'extrait phénolique obtenu et la masse de la matière première végétale traitée. (Yapo. 2007) Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivant :

$$R(\%) = (M1 / M0) \times 100$$

**R** : Rendement de l'extraction en % ;

**M1** : Masse en gramme de l'extrait phénolique obtenu ;

**M0** : Masse en gramme de la matière végétale initiale.

### II.3.3. Extraction des huiles essentielles

#### II.3.3.1. Dispositif d'extraction

Extraction de l'huile essentielle a été extraite des feuilles de *Thymus vulgaris* par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau (figure 06). Le principe de cette méthode consiste à récupérer l'huile essentielle (HE) des végétaux, en faisant passer à travers ces derniers un courant de vapeur d'eau, qui va entraîner ces composés volatils. La matière végétale à traiter n'est pas mise en contact direct avec l'eau. La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et



les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (El Haib, 2011). L'opération de distillation dure deux heures, à la température 100°C pendant 2 heures.



**Figure 06:** Extraction des huiles essentielles

#### **II.3.4. Rendement des huiles essentielles**

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal utilisé pour cent. Après récupération d'huiles essentielles, le rendement est calculé par la méthode suivante (Afnor ; 2000).

$$R^{HE} = M'/M. (100)$$

**R<sup>HE</sup>**: rendement en huiles essentielles.

**M'**: masse d'huiles essentielles obtenu en gramme.

**M**: prise d'essai du matériel végétal utilisée en gramme.

### **III. L'étude d'activité antimicrobienne**

#### **III.1. Méthode de détermination de l'activité antimicrobienne des extraits étudiés**

La détection des propriétés biologiques nécessaires pour la suivre des plantes est parmi les bases dans la recherche propriétés biologiques similaires pour combattre différents microorganismes responsables de plusieurs maladies infectieuses chez l'homme et l'animal. Ces recherches ont tendance à faire face à la résistance aux antibiotiques des microorganismes pathogènes (Miguel, 2010).

Pour la détermination de l'activité antimicrobienne, on a utilisé la méthode de diffusion de disque dans un milieu gélosé (Aromatogramme).

### **III.1.1. Etude de l'aromatogramme (par les disques)**

#### **III.1.1. 1. Principe**

L'activité antibactérienne est évaluée par la méthode d'aromatogramme qui permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis à vis d'un extrait donnée. La méthode de l'aromatogramme consiste à utiliser des boites de Pétri contenant un milieu gélosé convenable, déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée.

Des disques en papier wattman de 6mm de diamètre, préalablement imprégnés de quantités connues d'huile essentielle et de l'extrait phénolique (07µl), sont alors placés en surface de la gélose. Généralement, les micro-organismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition (Wilkinson, 2006).

#### **III.1.1. 2. Procédure**

Ensemencement des germes sur les boîtes pétri par écouvillons. Dans chaque boite de Pétri ensemencée on applique 2 disques.

\* Le premier imbibé par le DMSO pour confirmer le non activité sur les germes (contrôle négative).

\* Le deuxième imprégné par extrait pure des feuilles ou l'huile essentielle.

#### **III.1.1.3. Détermination de la sensibilité**

La sensibilité aux différents extraits est organisée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit : non sensible (-) pour le diamètre moins sensible de 6 mm ; sensible (+) pour un diamètre entre 9-14 mm ; très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15-19 mm et extrêmement sensible (+++) pour le diamètre plus que 20 mm (Ponce et al, 2003).

### **III .1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits testés a été déterminée par la méthode de micro dilution en bouillon (CLSI, 2009) à l'aide d'une microplaque à 96 puits. Chaque puits reçoit 10µL de suspension bactérienne ( $10^5$  CFU/ml) et 100 µL d'extrait phénolique de feuilles et d'huiles essentielles a différentes dilutions (de 10, 30, 60, 90, 120, 150 et 180 mg / ml) et 90 UI de bouillon nutritif. Le contrôle positif contient 90µL de bouillon nutritif, et 10µL de bactérie a testé, le contrôle négatif contient que le bouillon nutritif. La CMI a

été définie comme la concentration la plus faible à laquelle aucune croissance bactérienne n'a été observée après incubation à 37 °C pendant 24 heures (Klancnik, 2010).

Après 24h on ajoute 40µL de TTC (colorant) et on observe les résultats après incubation à 37 °C pendant 30 min.

### **III .1.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

La concentration minimale bactéricide (CMB) est la concentration de l'antimicrobien qui ne laisse pas plus de 0,01 % de germes survivants. Sa détermination a commencé par ensemencement de ces différentes dilutions de CMI dans des sillons en boucle de 5 cm de long à l'aide d'une calibrant de 2 µl , sur une gélose Muller –Hinton incubé a 37 ° C pendant 24 heures pour évaluer l'effet bactérienne des extraits. Bactéricide lorsqu'aucune croissance visible n'est observée et bactériostatique lorsqu'il y a formation de colonies.

## **IV. Étude d'activité antioxydant**

### **IV.1. Méthode de piégeage des radicaux libres ,2diphényl-1-picryl hydrazyl (DPPH°)**

La capacité des polyphénols de *T.vulgaris* à piéger le 2,2-diphényl-2 picrylhydrazyle DPPH), a été évaluée à l'aide de méthode de Yang et al ,2008. Le picryl- hydrazyl diphényl (DPPH) est un radical libre stable, violet en solution et avec une absorbance caractéristique à 517 nm . Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényl picryl-hydrazine par un composé anti-radicalaire entraînant une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) (Sanchez-Moreno, 2002). La réaction peut être résumée par  $DPPH + (AH) \rightarrow DPPH-H + (A)$  Où (AH) n est un composé capable de céder de l'hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényl picryl hydrazine (jaune) . Un millilitre de la solution de méthanol EPFIO à différentes concentrations a été ajouté à 3 ml d'une solution de méthanol DPPH à 0,1 mg / ml . Après 20 min d'incubation à 27°C, l'absorbance a été mesurée à 517 nm contre un contrôle. L'acide ascorbique et la quettine ont été utilisés antioxydants de référence. Le pourcentage de piège DPPH a été calculé comme suit :

Taux (%) d'activité anti radicalaire =  $(1 - (Abs\ EPFIO / Abs\ contrôle)) \times 100$

Les valeurs IC50 (50 % de concentration inhibitrice) ont été déterminées à partir de courbe d'activité d'inhibition du DPPH radicaux en fonction des concentrations de l'extrait par la méthode de régression . Ces valeurs sont exprimées en mg / ml.

## **Chapitre II**

### ***Résultats et discussion***

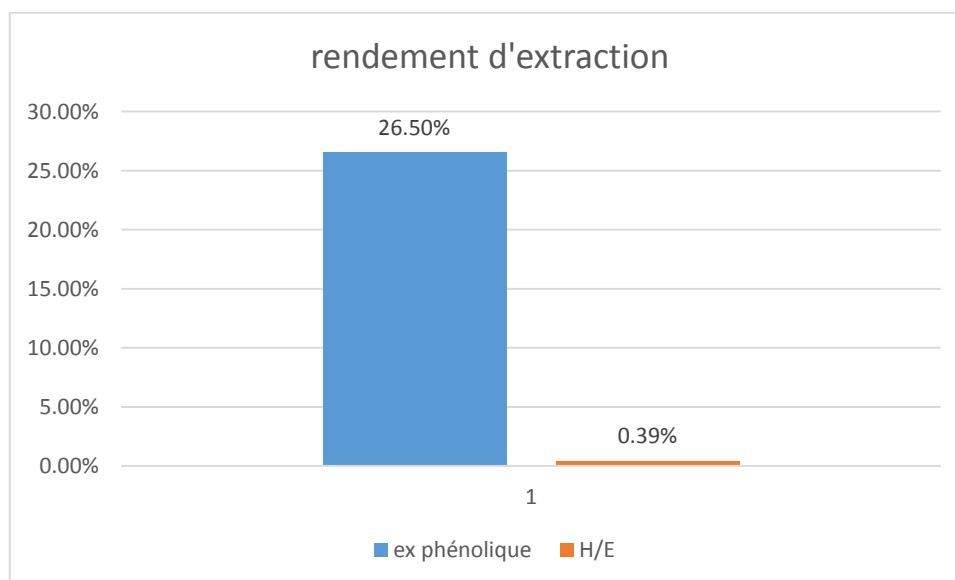
### I. Rendement d'extrait

Les rendements des extraits sont définis comme le rapport entre la quantité de substances végétales extraites et la quantité de matière végétale utilisée.

Le rendement de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation et le rendement de l'extrait obtenu par macération à partir de *Thymus vulgaris* sont représentés dans le tableau 04 et la figure 07.

**Tableau 04** : le rendement d'extraction d'huile essentielle et extrait phénolique

	HE	Extrait
Le rendement en pourcentage (%)	0,39 %	26,5 %



**Figure 07** : Diagramme de rendement d'extraction de *T.vulgaris*

On remarque que nos résultats de rendement d'H.E est proche à celle trouvée par Hazzit *et al.* (2009) et Amarti *et al.* (2009) qui ont rapporté des valeurs de 0,4% et 0,3% respectivement. En revanche, notre valeur paraît plus faible comparée à celles rapportées par Dob *et al.* (2006) et Zayyad *et al.* (2014) qui ont trouvé des rendements de 1,13% et 2,96% respectivement.

Chemat *et al.* (2012) ont mis en évidence l'influence de la période de conservation qui a affecté beaucoup la proportion de rendement de *Thymus algeriensis*. Selon leurs résultats, le taux de rendement est inversement proportionnel à la durée de conservation. Mebarki (2010), a trouvé que le meilleur rendement de *Thymus fontanesii* est obtenu durant la période de floraison (mai-

juillet). L'origine géographique, le stade végétatif de la plante, la période de récolte, les conditions climatiques et édaphiques (facteur écologique lié au sol) le lieu, la température et la durée de séchage, les parasites et la méthode d'extraction, tous ces facteurs peuvent aussi jouer un rôle déterminant pas seulement sur le rendement mais également sur la composition chimique de l'HE (Svoboda *et al*, 1999).

## II. Evaluation d'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et l'extrait de *T.vulgaris*

### II.1. L'aromatogramme

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 05 et illustré en figure 08 et 09 pour l'huile essentielle et figure 10 pour l'extrait.

**Tableau 05:** Les valeurs des diamètres de la zone d'inhibition des l'huile essentielle et de l'extrait de *T. vulgaris* aux dix souches bactériennes

Les extraits	Extrait (polyphénols)	Huile essentielle
les souches	Diamètre des zones d'inhibition en mm	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25 mm	37 mm
<i>Escherichia coli</i>	14 mm	22 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12 mm	35 mm
<i>Candida albicans</i>	9 mm	22 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7 mm	35 mm
<i>Proteus mirabilis</i>	15 mm	34 mm
<i>Staphylococcus aureus clinique</i>	18 mm	22 mm
<i>Escherichia coli clinique</i>	7 mm	17 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa clinique</i>	10 mm	8 mm
<i>Candida albicans clinique</i>	15 mm	22 mm

Nos résultats montrent des zones d'inhibition autour de disque d'huile essentielle sur les bactéries référencées et clinique (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et la levure *Candida albicans*) figure 08 et 09.

Nos résultats montrent que les H.E du *T. vulgaris* exercent un effet antibactérien très accentué sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec un diamètre d'inhibition moyen de 37mm figure 08. De même, un effet antibactérien très prononcé de l'HE du *T. vulgaris* a été, observé

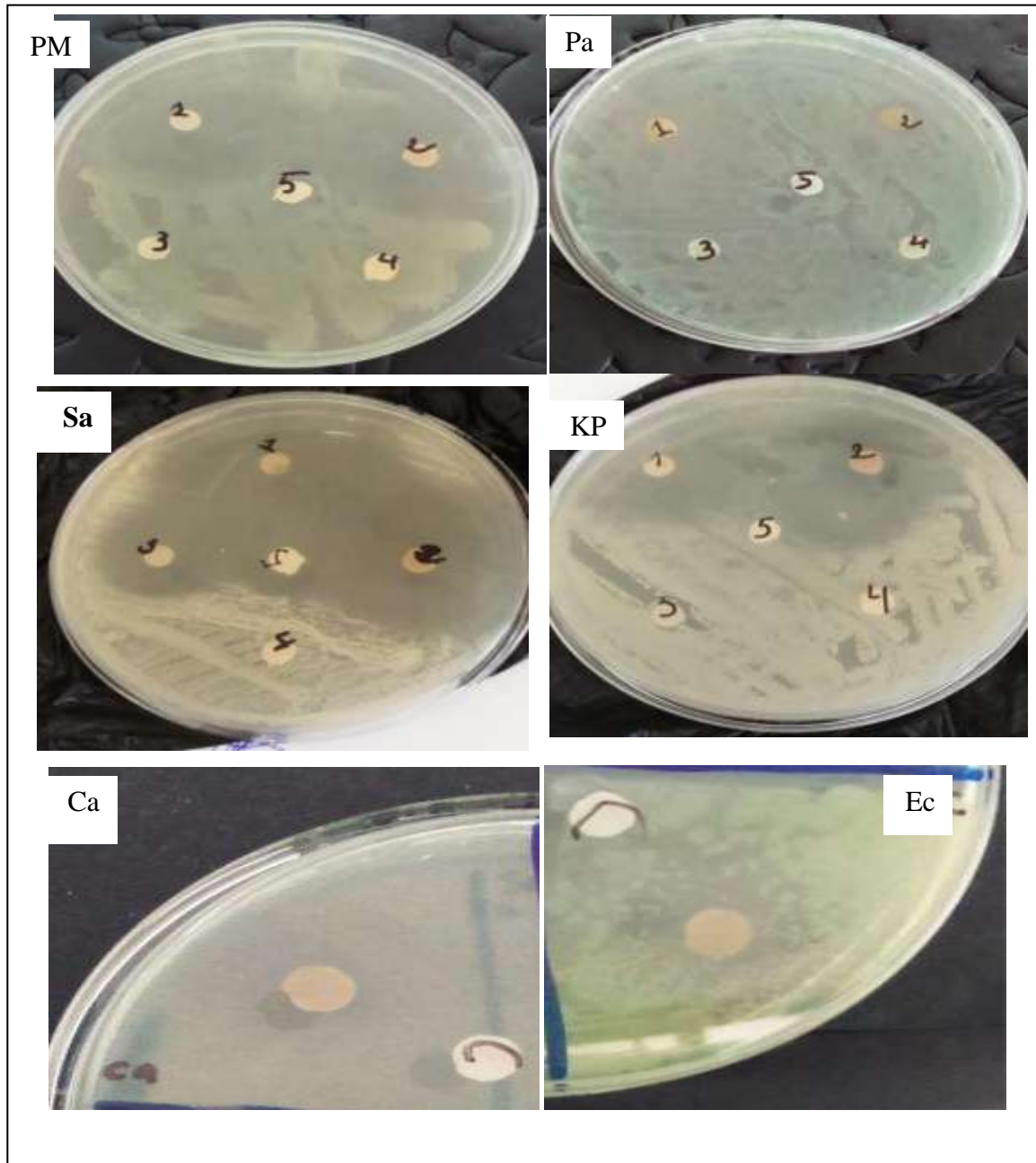
sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec un diamètre de 35mm et *Proteus mirabilis* ATTC 23659 avec 34mm.

Les grandes zones d'inhibition ont été constatées chez la bactérie référencée : *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATTC 70603 *Proteus mirabilis* ATTC 23659 et chez la bactérie clinique : *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* qui testées avec l'huile essentielle de *T.vulgaris*, les diamètres des zones d'inhibition varient de 22mm à 37mm.

En revanche, nos résultats montrent que l'extrait phénoliques de *T.vulgaris* exerce un effet inhibitrice sur toutes les souches référencées et cliniques, avec un diamètre des zones d'inhibition qui varient entre 7mm et 25mm.

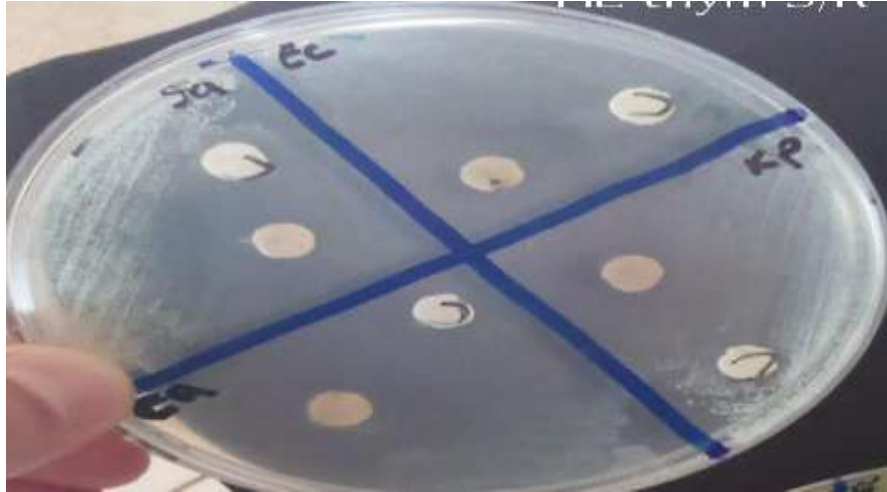
Le diamètre de zone d'inhibition diffère donc d'une bactérie à une autre. Selon (Ponce *et al.* 2003) et (Moreira *et al* ,2005), la sensibilité des germes a été classé par le diamètre des halos d'inhibitions comme suit : son sensible pour les diamètres moins de 8mm, sensible pour les diamètres de 9mm à 14mm, très sensible pour les diamètres de 15mm à 19mm et extrêmement sensible pour les diamètres de plus 20mm .

La grande zone d'inhibition a été constatée chez la bactérie *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 à l'égard d'extrait phénoliques de *T.vulgaris*, avec des zones d'inhibition qui varient de 18mm à 25mm. Donc *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 est une bactérie extrêmement sensible que les autres souches testées.

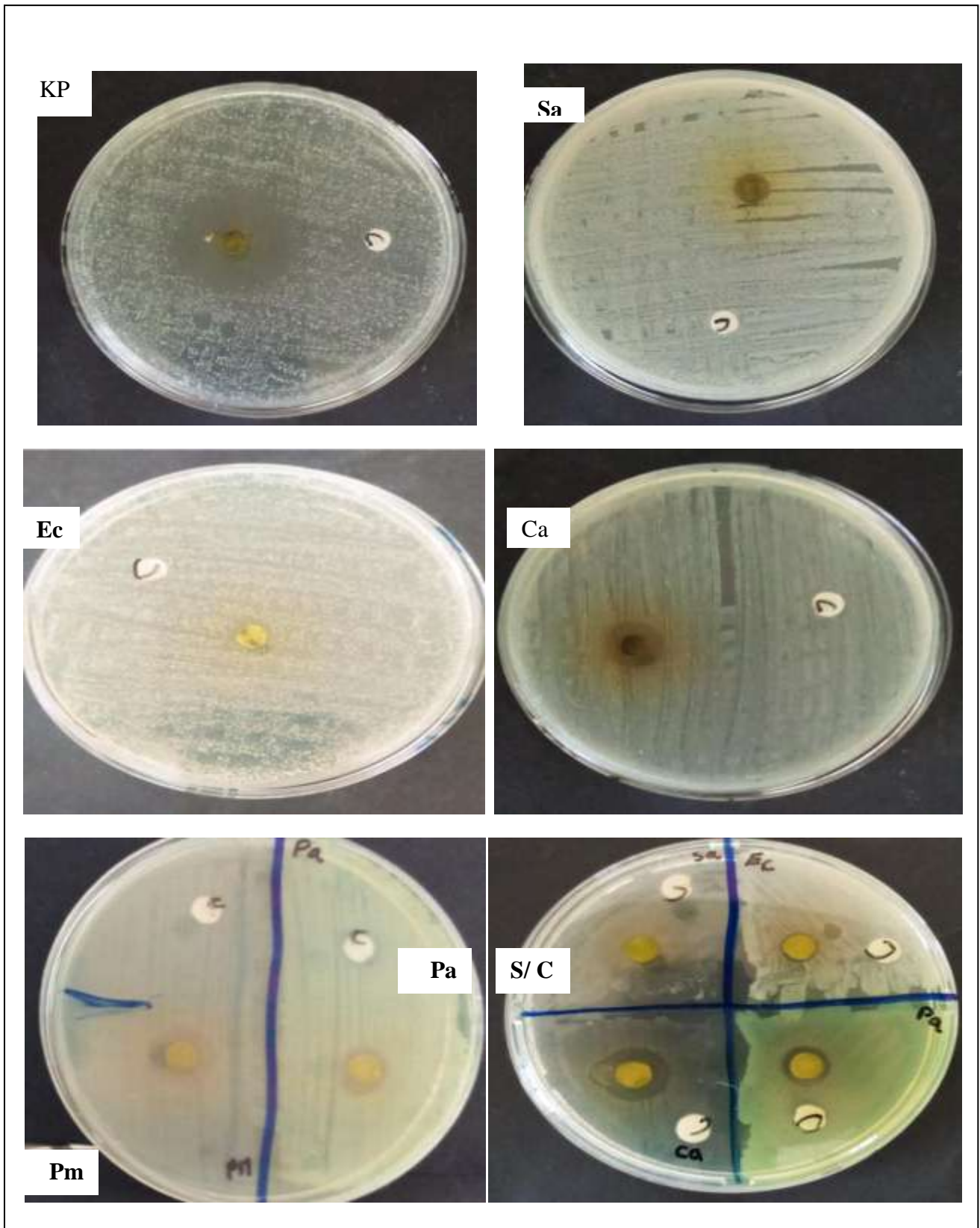


**Figure 08** : Les zones d'inhibition de l'huile essentielle de thym qui testé sur les souches référencées , **2** : l' huile essentielle de thym , **3** : DMSO , **Sa** : *Staphylococcus aureus* , **KP** : *Klebsiella pneumoniae* , **PM** : *Proteus mirabilis* , **Pa** : *Pseudomonas aeruginosa* , **Ec** : *Escherichia coli* , **Ca** : *Candida albicans*





**Figure 09:** Activité antimicrobienne de l'extrait d'huiles essentielles de *Thymus vulgaris* sur des souches bactériennes clinique : **Sa** : *Staphylococcus aureus*, **Ec** : *Escherichia coli*, **Ca** : *Candida albicans*, **Pa** : *Pseudomonas aeruginosa*, **c** : control négatif DMSO.



**Figure 10:** Activité antimicrobienne de l'extrait phénolique de *Thymus vulgaris* sur des souches bactériennes de référence et clinique : S/ C : souches cliniques

**Sa :** *Staphylococcus aureus*, **Ec :** *Escherichia coli*, **Ca :** *Candida albicans*, **KP :** *Klebsiella pneumoniae*, **Pa :** *Pseudomonas aeruginosa*, **PM :** *Proteus mirabilis*, **c :** control négatif DMSO

## II.2. Concentration minimal inhibitrice

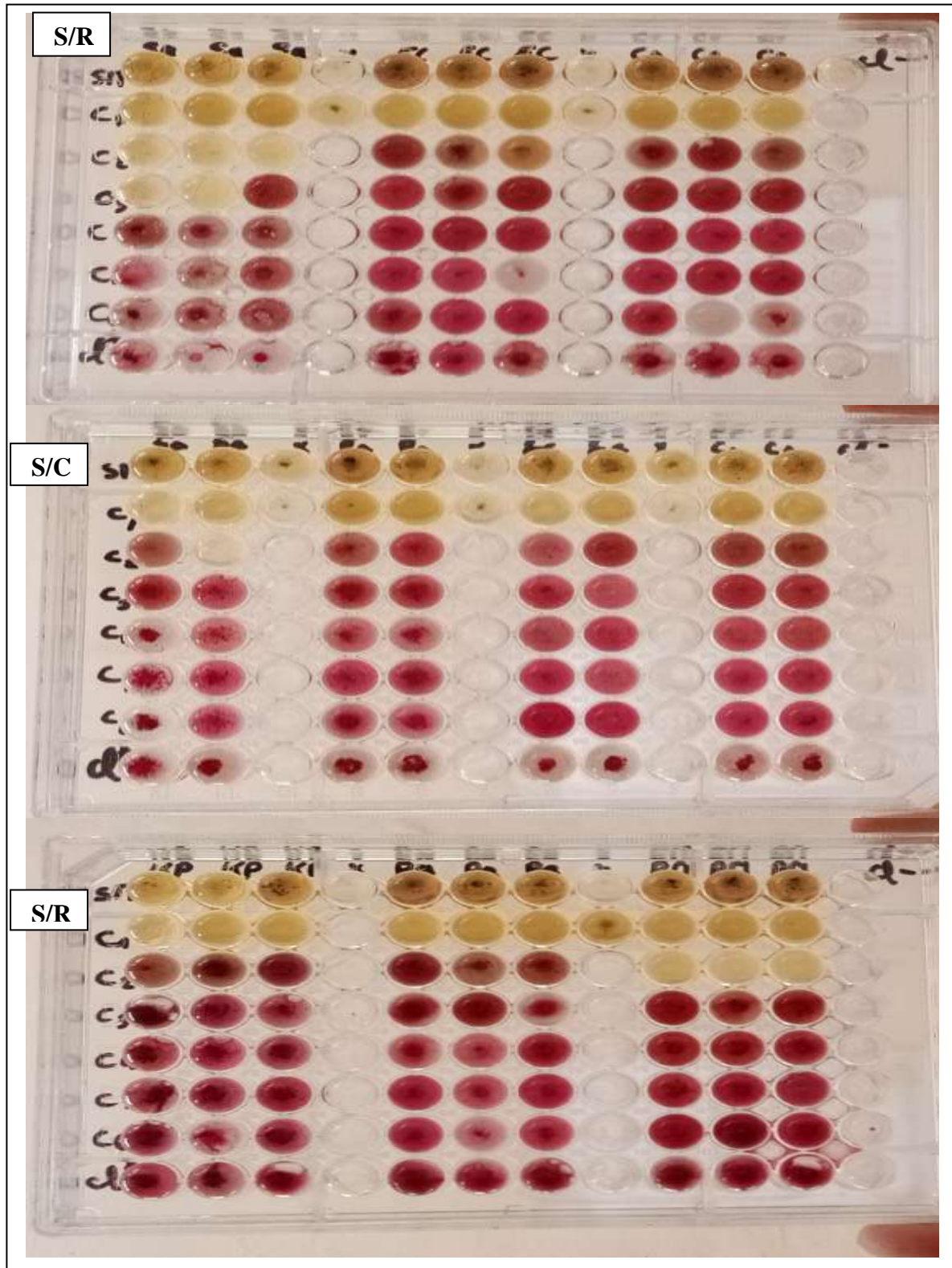
Les résultats relatifs aux concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'extrait phénolique des feuilles et l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, déterminés pour les bactéries présentant des zones d'inhibition supérieures à 7mm sont présentées dans le tableau 06 et illustrés dans les figures 11 et 12. Pour les concentrations (30, 60, 90, 120, 150 et 180mg/ml) la CMI n'a pas pu être déterminé car les concentrations étaient très élevées.

L'huile essentielle de *T.vulgaris* agit de manière similaire sur tous les germes avec une CMI de 0,04 mg/ml. L'effet de l'extrait phénolique de *T.vulgaris* et reste aussi important, avec une CMI variant entre 0,03 et 0,15 mg/ml pour l'ensemble des microorganismes testés.

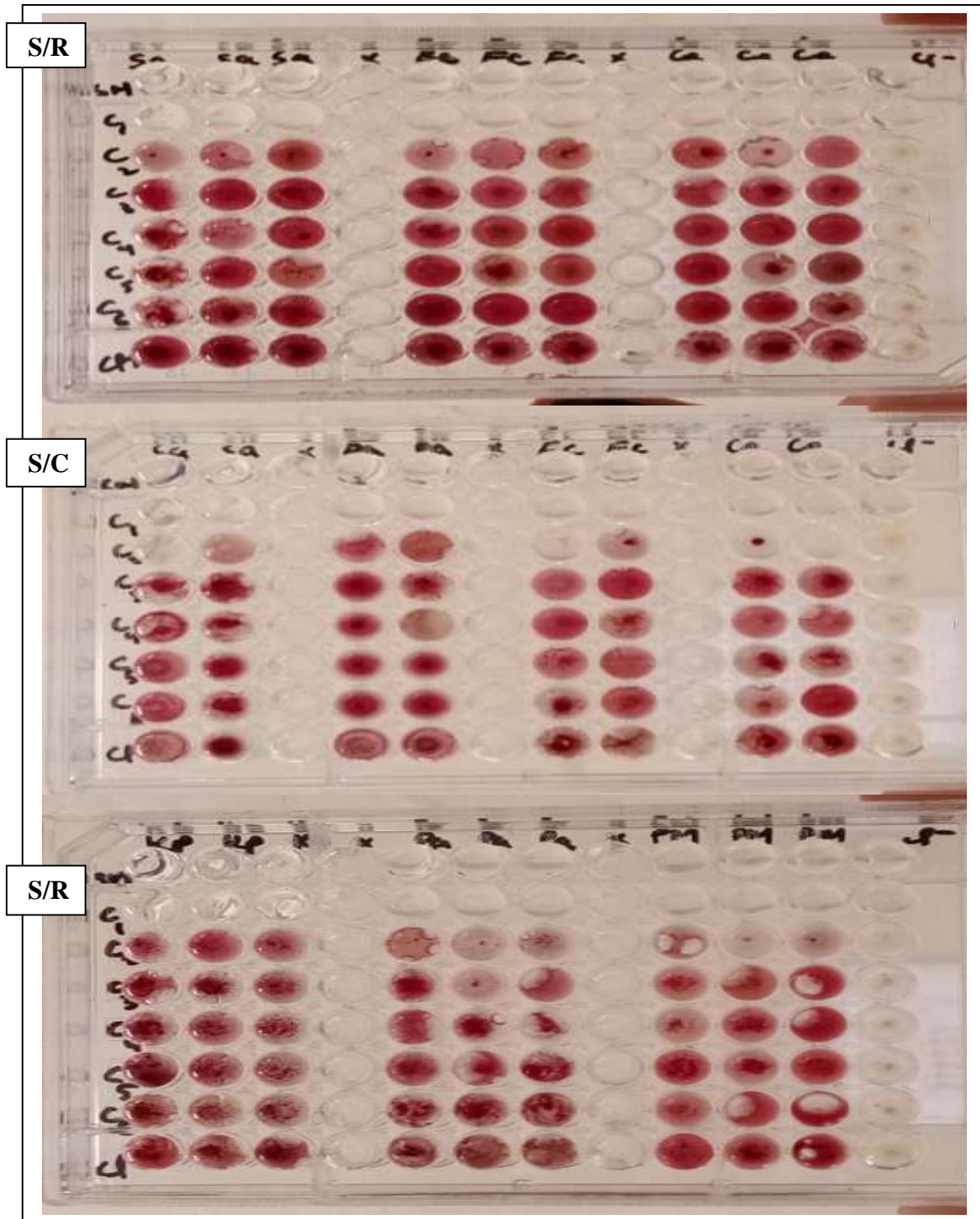
La CMI basse de l'extrait phénolique des feuilles, enregistré avec *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, naturellement connu par sa résistance aux antibiotiques Prometteuse pour traiter des infections causé par ce germe.

**Tableau 06:** Concentration minimal inhibitrice de l'extrait phénolique et l'huile essentielle de *T.vulgaris*.

Les souches	CMI de extrait (polyphénols) en mg / ml	CMI de l'huile essentielle En mg / ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,03	0,04
<i>Staphylococcus aureus clinique</i>	0,15	0,04
<i>Escherichia coli</i>	0,15	0,04
<i>Escherichia coli clinique</i>	0,15	0,04
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,7	0,04
<i>Pseudomonas aeruginosa clinique</i>	0,15	0,04
<i>Candida albicans</i>	0,15	0,04
<i>Candida albicans clinique</i>	0,7	0,04
<i>Proteus mirabilis</i>	0,7	0,04
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,15	0,04



**Figure 11:** Résultat CMI d'extrait phénolique *T.vulgaris* sur les souches référencées et clinique : **PM** : *Proteus mirabilis*, **Sa** : *Staphylococcus aureus*, **Ec** : *Escherichia coli*, **Ca** : *Candida albicans*, **KP** : *Klebsiella pneumoniae*, **Pa** : *Pseudomonas aeruginosa*, **Cl -** : control négatif, **Cl +** : control positif



**Figure 12:** Résultat CMI d'extrait d'huile essentiel *T.vulgaris* sur les souches référencées et clinique : **PM** : *Proteus mirabilis*, **Sa** : *Staphylococcus aureus*, **Ec** : *Escherichia coli*, **Ca** : *Candida albicans*, **KP** : *Klebsiella pneumoniae*, **Pa** : *Pseudomonas aeruginosa*, **CI -** : control négatif, **CI +** : control positif

### II.3 .Concentration Minimal Bactéricide (CMB)

Les résultats de détermination de CMB sont présentés dans le tableau 07 et illustrés sur les figures 13 et 14.

**Tableau 07:** Concentration minimale bactéricide CMB d'extraits phénoliques et l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

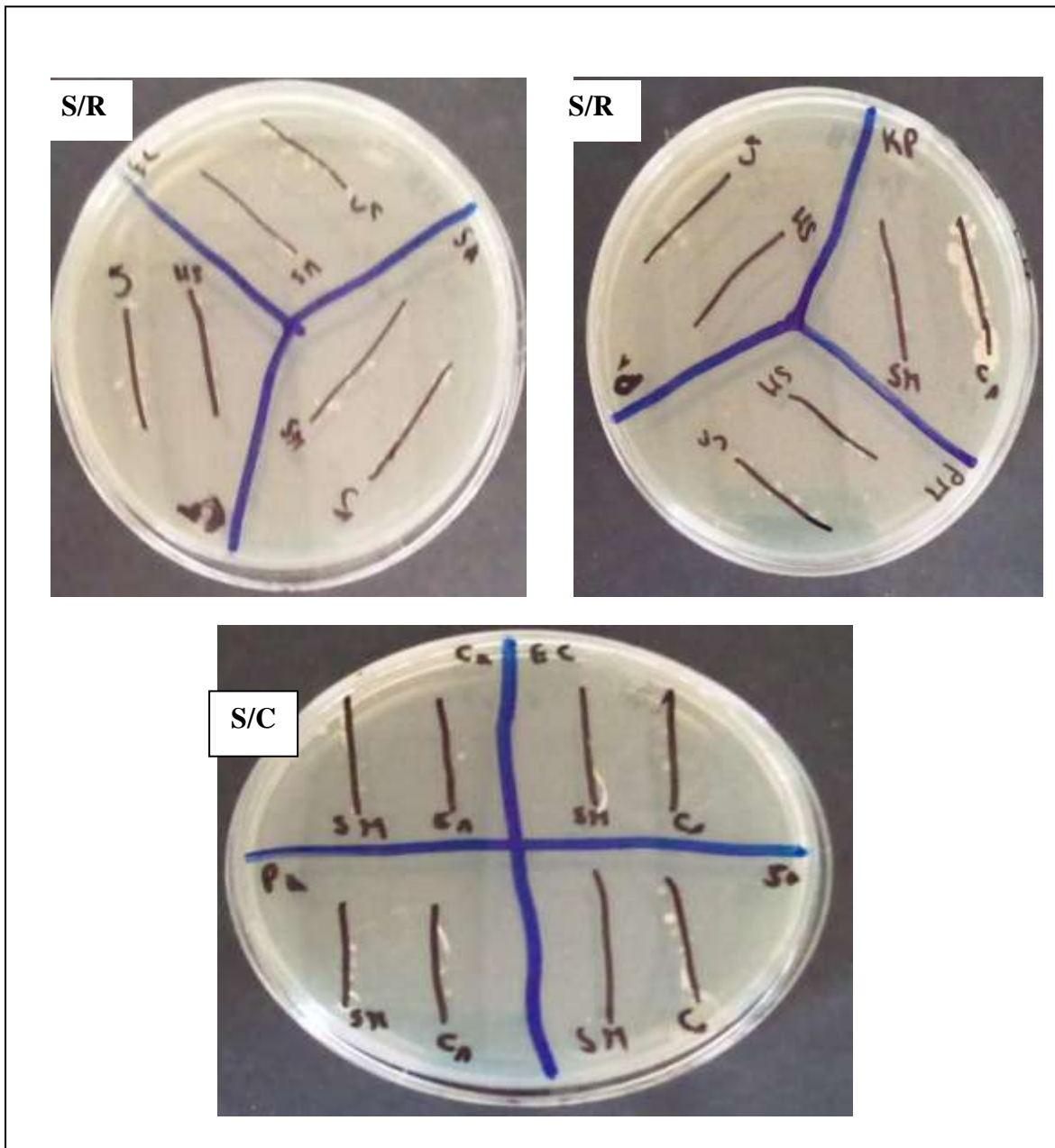
Les souches	CMB de l'extrait (poly phénol) en mg /ml	CMB de l'huile essentielle en mg /ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,15	0,04
<i>Staphylococcus aureus clinique</i>	0,15	0,04
<i>Escherichia coli</i>	0,3	0,9
<i>Escherichia coli clinique</i>	0,15	0,04
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,3	0,9
<i>Pseudomonas aeruginosa clinique</i>	0,15	0,04
<i>Candida albicans</i>	0,15	0,9
<i>Candida albicans clinique</i>	0,15	0,9
<i>Proteus mirabilis</i>	0,3	0,04
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,15	0,04

Les résultats obtenus après la détermination de la concentration minimale bactéricide sont présentés dans les figures 13 et 14. Les extraits sont considérés comme bactéricides lorsque le CMB est proche du CMI, et les extraits sont bactériostatiques lorsque le CMB est éloignée du CMI. Nous comparons les résultats de CMI et de CMB sur les souches testées, selon (Bouabdali *et al*, 2016).

CMB / CMI < 2 : bactéricide ;

CMB/CMI > 2 : bactériostatique ;

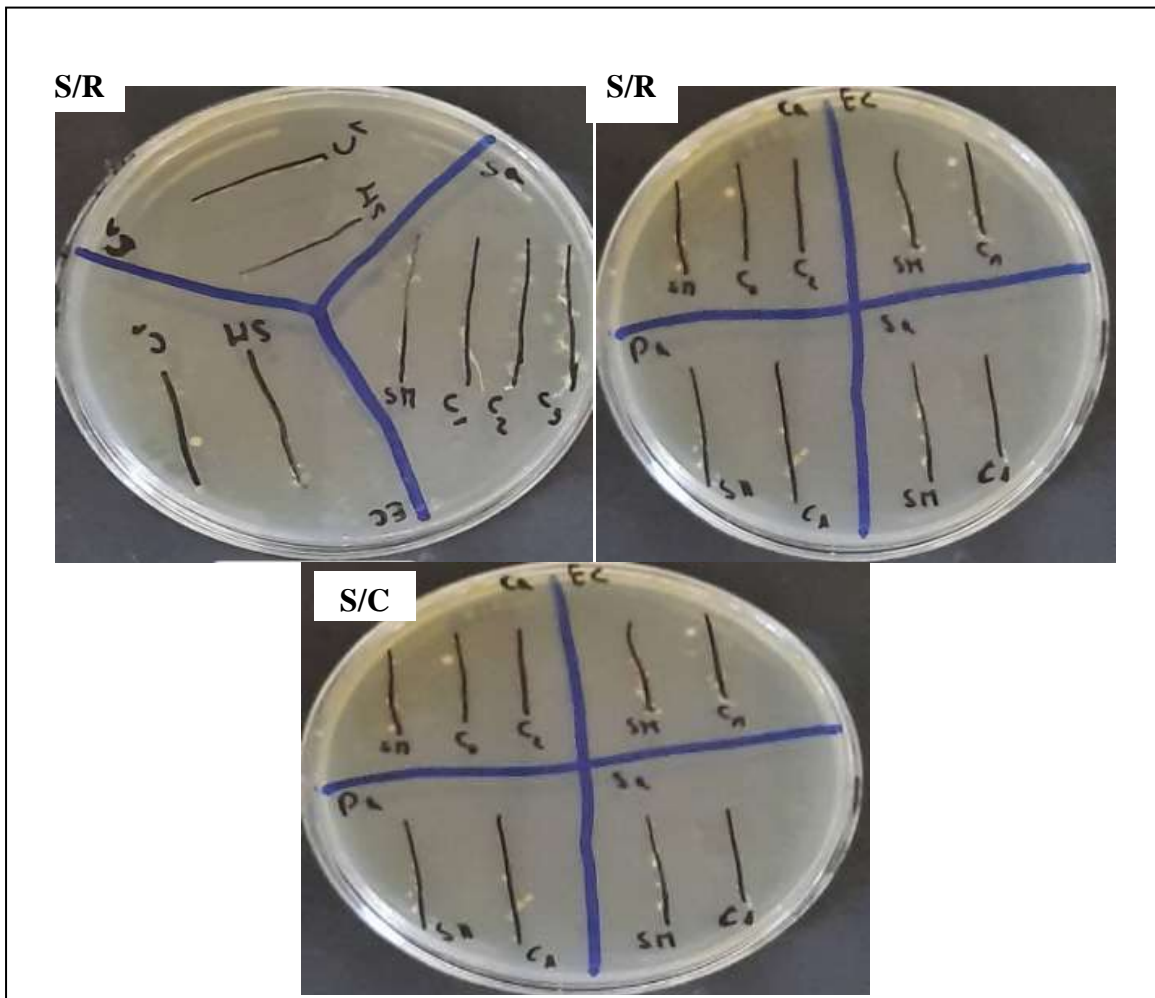
CMB /CMI > 32 : résistant. Tableau 07.



**Figure 13:** Détermination de CMB de l'extrait de l'huile essentielle de *T.vulgaris* sur les souches référencé et clinique : **PM** : *Proteus mirabilis*, **Sa** : *Staphylococcus aureus*, **Ec** : *Escherichia coli*, **Ca** : *Candida albicans*, **KP** : *Klebsiella pneumoniae*, **Pa** : *Pseudomonas aeruginosa*

Sur la base de ces résultats, il est confirmé que pour les souches cliniques : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* et les souches référencées : *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 et *Proteus mirabilis* ATTC 23659 la CMI est égale à la CMB.

Ceci prouve que l'huile essentielle de *T. Vulgaris* exerce une activité bactéricide contre ces cinq souches.



**Figure 14:** Détermination de la concentration minimale bactéricide de l'extrait phénolique de *T. vulgaris* sur les souches référencé et clinique : **PM** : *Proteus mirabilis*, **Sa** : *Staphylococcus aureus*, **Ec** : *Escherichia coli*, **Ca** : *Candida albicans*, **KP** : *Klebsiella pneumoniae*, **Pa** : *Pseudomonas aeruginosa*



Sur la base de ces résultats, il est confirmé que pour les souches cliniques : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et les souches référencées : *Candida albicans* ATTC 10230 et *Klebsiella pneumoniae* ATTC 70603, la CMI est égale à la CMB. Ceci prouve que l'extrait phénoliques des feuilles de *T. Vulgaris* exerce une activité bactéricide contre ces quatre souches. Pour *Escherichia coli* cliniques et les souches *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853, *Escherichia coli* ATTC 25922 et *Proteus mirabilis* ATTC 23659, la CMB est égale SM (solution mère). Les souches *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 et *Candida albicans* clinique, la CMB est égale C1.

**Tableau 08** : Concentration minimale inhibitrice (mg/ml) et concentration minimale bactéricide (mg / ml) des extraits de *Thymus vulgaris*.

les souches	Les extraits							
	Polyphénols				Huile essentielle			
	CMI	CMB	CMB/ CMI	Effet bactérien	CMI	CM B	CMB / CMI	Effet bactérien
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,03	0,15	05	Bactériostatique	0,04	0,04	01	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i> clinique	0,15	0,15	01	Bactéricide	0,04	0,04	01	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	0,15	0,3	02	Bactéricide	0,04	0,9	22,5	Bactériostatique
<i>Escherichia coli</i> clinique	0,15	0,15	01	Bactéricide	0,04	0,04	01	Bactéricide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,7	0,3	0,42	Bactéricide	0,04	0,9	22,5	bactériostatique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> clinique	0,15	0,15	01	Bactéricide	0,04	0,04	01	Bactéricide
<i>Candida albicans</i>	0,15	0,15	01	Bactéricide	0,04	0,9	22,5	bactériostatique
<i>Candida albicans</i> clinique	0,7	0,15	0,21	Bactéricide	0,04	0,9	22,5	Bactériostatique
<i>Proteus mirabilis</i>	0,7	0,3	0,42	Bactéricide	0,04	0,04	01	Bactéricide
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,15	0,15	01	Bactéricide	0,04	0,04	01	Bactéricide

### III. Résultat du test anti radicalaire au DPPH

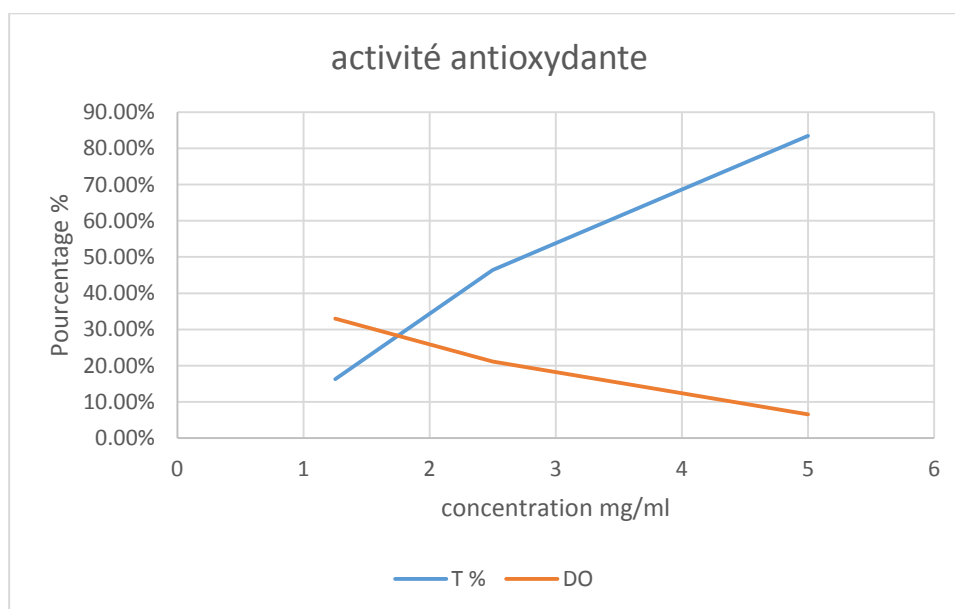
L'activité antioxydant d'extrait de thym vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par la déviation de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm.

Le DPPH est caractérisé par son adaptation à plusieurs échantillons dans une courte durée, aussi il est assez sensible pour détecter les ingrédients actifs à des basses concentrations, à cet effet, il a été employé pour le criblage des activités anti radicalaires des extraits végétaux (Yi et al, 2007). Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron ; la forme non radicalaire DPPH-h est formée.

Le pouvoir antioxydant d'extrait brut des feuilles de Thym a été évalué en mesurant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH. Les résultats du test anti radicalaire au DPPH d'extrait brut des feuilles de Thym ont révélées un pourcentage d'inhibition du radical DPPH, significatif et très élevés de 83,50% , ces résultats représenté dans le tableau 09 et illustrés dans le figure 15 .

**Tableau 09 :** L'activité anti oxydante des polyphénols des feuilles de *T.vulgaris*.

Les concentrations	Témoin	1,25mg/ml	2,5mg/ml	5mg/ml
DO	0,394	0,330	0,211	0,065
Le pourcentage d'activité.	/	16,24%	46,44%	83,50%

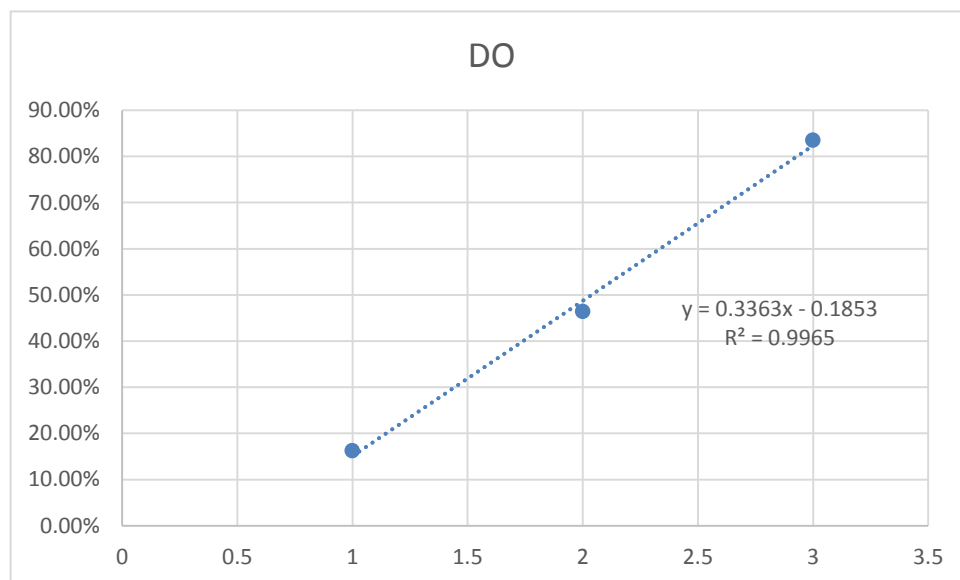


**Figure 15:** Pourcentage d'inhibition de radical DPPH en fonction des concentrations d'extrait phénolique

Les résultats obtenus indiquent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation des concentrations d'extrait phénolique qui inversement proportionnelle avec la densité optique.

#### IV. Détermination de l'IC50 (Concentration inhibitrice 50%)

À des fins comparatives, nous avons évalué l'IC50 de l'extrait phénolique de *T. vulgaris*. Cet indicateur exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour faire décroître la concentration initiale du DPPH• à la moitié (50%). L'IC50 est inversement liée à la capacité antioxydant d'un composé. Cela veut dire que la capacité antioxydant d'un composé est d'autant plus élevée que son IC50 est petite. Les valeurs de l'IC50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire comme c'est illustré dans la figure 16.



**Figure 16:** Détermination de la valeur IC50 de l'extrait phénolique de *T. vulgaris*

Le *T.vulgaris* marque une valeur de 1541,8µg/ml. Cette activité est inférieure à celle de l'acide ascorbique pris comme antioxydant de référence (CI50 =52,5±1,5µg/ml).

D'un autre côté, nous notons qu'il y a une corrélation entre la concentration des polyphénols et l'activité antioxydant, ce qui confirme que les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. Ces résultats sont conformes à ceux de plusieurs auteurs qui ont rapporté une telle corrélation positive entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydant (Makris *et al* 2007 ; Angelov *et al*, 2008 ; Berrin *et al* 2008 ; Bozan *et al*, 2008 Hua *et al*, 2008). En effet

Falleh *et al* (2008) ont montré que l'activité antioxydant ne dépend pas seulement de la concentration des polyphénols, mais également de la nature et la structure des antioxydants dans l'extrait. Généralement, les polyphénols ayant un nombre élevé des groupements hydroxyles présentent une activité antioxydant très importante (Heim et al 2002 ; Torres et al 2007).

# *Conclusion*

**Conclusion**

En vue de l'importance thérapeutique et économique des plantes médicinales, cette étude a été réalisée afin d'explorer les activités biologiques d'extrait méthanoïques et de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* qui est une plante médicinale appartenant à la famille des Lamiacées. L'ensemble des résultats obtenus nous ont permis de constater les points suivants :

Le rendement obtenu à partir des extraits phénoliques est de 26,5% et 0,39% pour l'huile essentielle.

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode de l'aromatogramme a montré un effet antimicrobien très remarquable des H.E de *T.vulgaris* sur les dix souches pathogènes testées. Les diamètres des zones d'inhibition varient de 7mm à 25mm pour l'extrait phénolique, et de 8mm à 37mm pour l'huile essentielle. Les valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) sont de 0,04mg/ml pour l'huile essentielle et de 0,03mg/ml à 0,15mg/ml pour l'extrait phénolique de cette plante. Tandis que les concentrations minimales bactéricides varient entre 0,03mg/ml et 0,15mg/ml pour l'extrait phénolique et de 0,04mg/ml pour l'huile essentielle pour la majorité des microorganismes testés. Ces activités sont liées à la qualité des composées phénoliques détectées dans cette plante. Des recherches qualitatives et quantitatives de ces composés chez *T.vulgaris* ont montré que l'extrait au méthanol était riche en substances phénoliques. D'après nos résultats, nous avons constaté que l'effet de l'huile essentielle est plus important que celui des extraits. Les résultats montrent que l'extrait du *T.vulgaris* possède une forte activité antimicrobienne représentée avec diamètres d'inhibition varient entre 7mm à 25mm pour l'extrait phénolique et avec un diamètre de 8mm à 37mm pour l'huile essentielle.

Nous avons également déterminé l'activité antioxydant de l'extrait phénolique de *T.vulgaris*, Les résultats du test des antis radicaux libres avec le DPPH étaient significatifs et très élevés (83,50%). Tous ces résultats obtenus *in vitro* ne sont qu'une première étape dans la recherche de substance naturelle biologiquement active, ces travaux ont fourni une base scientifique pour l'utilisation de *Thymus vulgaris* dans le traitement des pathologies microbiennes.

# *Références bibliographiques*

## Référence bibliographiques

1. AFNOR., 2000. Huiles essentielles. Échantillonnage et méthodes d'analyse Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2).
2. Amarti, F. (2009). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf) .Benth du Maroc. *Biotechnology .Agron .Soc. Environ*14(1) ,141-148.
3. Angelov G., Boyadzhiev L., Georgieva S. Antioxydant properties of some Bulgarian wines. *Journal of International Scientific Publication: Materials, Methods and Technologies*, 3(1), 143-150. 2008.
4. Askin Erdogan et Satish S. C. Rao, « Small Intestinal Fungal Overgrowth », *Current Gastroenterology Reports*, vol. 17, no 4, 16 avril 2015 , p.
5. Azoulay E, Russell L, Van de Louw A, Metaxa V, Bauer P, Pova P, Montero JG, Loeches IM, Mehta S, Puxty K, Schellongowski P, Rello J, Mokart D, Lemiale V, Mirouse A (février 2020) . « Diagnostic des infections respiratoires sévères chez les patients immunodéprimés ». *Médecine de soins intensifs*. 46 (2) : 298–314.
6. Ben Haj Khalifa A.Moissenet D. Vu Thien H. Khelder M. Les facteurs de virulence de *pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. *AnnBiol clin* 2011 :69(4) :393-403.
7. Bennett, R.J. et A.D. Johnson, « Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle », *Annu rev Microbiol*. No 59,« 255-p. 233 ,2005
8. Berrin Bozan, Feral Temelli *Technologie des bioressources* 99 (14), 6354-6359, 2008.
9. Berrin Bozan, Goksel Tosun, Derya Ozcan. Study on polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antioxydant activity. *Food chemistry*, 209, 426-430. 2008.
10. Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Bouhdid D., Skali N.S., et Abrini J. 2006. *Thymus* Essentialoils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès International de biochimies*, Agadir. 324-327
11. Brown G D, Denning DW, Gow NA, et al. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 2012; 4: 165rv113.



12. Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> Edition. Paris. Technique et Documentation. 1120p
13. Burits M. et Bucar F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, 14, 323-328.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI (2009). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard, 29, 1-65.
15. Cuendet M., Hostettmann K. et Potterat O., 1997. Iridoid glycosides with free Radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80, 1144-1152.
16. Demetrio LV, Phyllis Anne P, Esperanza C, Windell LR (2016) Molecular and Phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a Tertiary hospital in the Philippines. *Tropical Medicine and Health* 44 :3
17. Dob T., Darhmane De., Benbdelkader T. Chelghoum T.C. (2006) .*Int. J. Aromatherapy*, 16:95-100.
18. Epifano F., Genovese S., Menghini L. and Curini M. 2007. Chemistry and pharmacology of Oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* ; 68 : 939-953.
19. Epifano F., Genovese S., Menghini L., et Curini M. 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*. 68: 939 – 953
20. Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies*. 331: 372-379. 2008
21. Fleuriet A., Jay-Allemand C., et Macheix J.J. 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. pp 121-216
22. Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J., 2005. Composés phénoliques des végétaux un Exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et Universitaires romandes pp 121-216
23. Goulet O. La flore intestinale : un monde vivant à préserver. *Journal de pédiatrie et de puériculture* (2009) 22, 102—106
24. Grieve M., 1931. *A modern herbal*, Vol. 2.
25. Guillén M. D., Manzanos M. J. (1998) Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris* L. plant. *Food chemistry*. 63 (3): 373-383.

26. Haddouche F et Benmansour A (2008).Article de synthèse : Huiles essentielles et activités Biologiques, Application à deux plantes aromatiques. Journal les technologies de laboratoire N°8.
27. Heart T. Shears P. Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Sciences-Flammarion. 2006.
28. Heim, K-E., Tagliaferro, A-R., Bobilya, D-J.Flavonoidantioxydants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutrition and Biochemistry, 13: 572–584. 2002.
29. Hmamouchi M. 1999. Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. Edition Fedala, Mohammedia
30. Iserin P. (2001) Encyclopédie des plantes médicinales. 2Eme Ed. Larousse. Londres Pp : 143 et 225-226
31. J. B. Hárborn & T.Swain. Perspectives in Phytochemistry. Academic Press, London, New York.1969.
32. JP. Flandrois. Bactériologie Médicale. Coll. Azay. Puf. 2000.
33. Katya P Svoboda, Janice B Hampson Département de biologie végétale, SAC Auchincruive, Ayr, Écosse, Royaume-Uni., KA6 5HW 16, 1-7, 1999.
34. Klaas, C. A., Wagner, G., Laufer, S., Sosa, S., Loggia, R. D., Bomme, U., Pahl, H. L. and Merfort, I. (2002). Studies on the anti-Inflammatory Activity of Phytopharmaceuticals
35. Kon K., et Rai M. 2012. Antibacterial activity of Thymus vulgaris essential oil alone and in Combination with other essential oils. Bioscience. 4 : 50–5
36. Kulišić T., Dragović-Uzelac V., et Miloš M. 2006. Antioxydant activity of aqueous tea Infusions prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. Food Technology and Biotechnology.44 (4) : 485-492.
37. Lawlor MS, Hsu J, Rick PD, Miller VL: Identification of Klebsiella pneumoniae virulence determinants using an intranasal infection model. Mol Microbiol 2005, 58:1054-1073.
38. Leleu G, Aegerter P, Guidet B, Collège des utilisateurs de base de données en réanimation. Systemic candidiasis in intensive care units: a multicenter, matched-cohort study. J Crit Care 2002 ; 17 : 168-75.
39. Lesueur De., Serra D.de Rocco, Bighelli A., Hou T.M. Ban N.K. Thai T. H., Casanova J., 2007. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of Michelia faveolata Meryll ex Dandy from Vietnam. Flavour and Fragrance Journal, 22,317-321.
40. M Hazzit, A Baaliouamer, AR Veríssimo, ML Faleiro, Maria Graça Miguel Chimie alimentaire 116 (3), 714-721, 2009.

41. Makris D. P., Boskou G., Andrikopoulos N. K. Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*, 98, 2963-2967. 2007.
42. McFall-Ngai, Margaret (2007-01-11). « Immunité adaptative : Prendre soin de la communauté ». *Nature*. 445 (7124) : 153.
43. Mebarki N., 2010. Thèse de magistère .de chimie, Université – M’Hamed Bougara – Boumerdes.
44. Morales, R. 2002.The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus* .In: *Thyme: the genus Thymus*. Ed. Taylor & Francis, London. pp 1-43
45. Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., & Roura, to reduce a foodborne pathogen LWT- *Food Science and Technology*,38(5),565-570.
46. Nadia Zayyad, Abdellah Farah, Jamila Bahhou *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 83 (118), 132, 2014.
47. Nagendran B., Kalyana S., et Samir S. 2006. Phenolic compounds in plants and Agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*. 99 : 191-203.
48. O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification et signification clinique de *Proteus*, *Providencia* et *Morganella*. *Clin Microbiol Rév.* 2000 ; 13 : 534–546.
49. Peter K.V., (2004). *Handbook of herbs and spices*. Elsevier, 376p
50. Pitman V., (2004). *Aromatherapy: A practical approach*. Edition Nelson Thornes, 364p
51. Polese J.M., (2006). *La culture des plantes aromatiques*. Edition Artémis, 93p
52. Ponce A.G., Fritz R, Del Valle C. E. & Roura S. I., 2003- Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of organic Swiss chard. *Lebensmittel – Wissenschaft und – Technology*, 36: 679 – 684.
53. Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Satyam, S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med. Aromat Plants*, 3,164.
54. Prasanth Reddy, V., Ravi Vital, K., Varsha, P. V., & Satyam, S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med. Aromat Plants*, 3, 164.
55. Prepared from Arnica flowers, *Planta Med.*, 68, 385-39
56. Regnault-Roger C., Ribodeau M., Hamraoui A., Bareau I., Blanchard P., Gil-Munoz M.I., Et Barberan F.T. 2004. Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation
57. Rey C., (1990). La culture du thym en Suisse. *Revue horticole suisse*, 63 : 20-22.
58. Richard, H., Benjilali, B., Baouquour, N., Barिताux, O. 1985. Etude de diverses huiles essentielles de thym du Maroc. *Lebensn – Wiss U-Technol*.

59. Ryan, Kenneth J. ; Ray, C. George ; Ahmad, Nafees ; Drew, W. Lawrence ; Lagunoff, Michael ; Pottinger, Paul ; Reller, L. Barth ; Sterling, Charles R. (2014). « Pathogenèse des infections bactériennes ». *Sherris Medical Microbiology* (6<sup>e</sup> éd.). New York: McGraw Hill Education. P. 391–406.
60. Sagdic, O., Kuscu, A., Özcan, M., Özcelik, S. (2002) Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 19: 473-480
61. Santosham, Mathuram ; Chan, Grace J. ; Lee, Anne CC ; Baqui, Abdullah H. ; Tan, Jingwen ; Noir, Robert E. (2013). « Risque d'infection néonatale précoce avec infection maternelle ou colonisation : une revue systématique mondiale et une méta-analyse ». *PLO Médecine*. 10 (8) : e1001502.
62. Smain Chemat, Ratiba Cherfouh, Brahim Y Meklati, K Belanteur *Journal de recherche sur les huiles essentielles* 24 (1), 5-11, 2012.
63. Small E., Deutsch G., (2001). *Herbes culinaires pour nos jardins de pays froid*. NRC ResearchPress, 193p
64. Diels Alder/réarrangement de Irland-Claisen : Application à la synthèse de la Juvabione », These de Doctorat. Université de Neuchâte
65. Struve C, Krogfelt KA; Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. *FEMS Microbiol Lett* 2003, 218:149-154.
66. Takeuchi H., Lu Z.G., et Fujita T. 2004. New monoterpene glucoside from the aerial parts Of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Bioscience, biotechnology and biochemistry*. 68 (5) : 1113-1134.
67. Thomas A. Russo et Candace M. Marr, « Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* », *Clinical Microbiologie Reviews*, vol. 32, no 3, juin 2019 19 .
68. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, et al. Multiplex PCR assay For identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2003 ; 41(6) : 2669–2671.
69. Torres de pinedo, A., Pen alver, P., Morales, J.C. Synthesis and evaluation of new Phenolic-based antioxidant: structure activity relationship. *Food Chemistry*, 103:55-61. 2007.
70. Van Cleef BA, Monnet DL, Voss A (2011) Livestock-associated methicilline resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. *Emerg Infect Dis* 17 : 502
71. Victoria Cano et al. ; *Klebsiella pneumoniae* triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells ; *BMC Microbiology* 2009, 9 :156doi :10.1186/1471-2180-9-156 ; on line : 2009/08/03

72. Wilkinson J.M., 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII. Pp.157-165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais My. Drugs. Ed. WILEY -VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheima, 405p.
73. Yabi, I., Afouda, F., & Boko, M. (2006). Role des groupements feminins agricoles dans La securite alimentaire : Cas de la commune de save au Benin. Journal de la Recherche Scientifique de l'Université de Lomé, 8(2).
74. Yi Z , B., Yu Y., Liang Y.-Z. Zeng B. (2007): In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of Pericardium Vitro Reticulate of a new Citrus cultivar and its main flavonoids, LWT-Food Science and Technology. 4:1000-1016.
75. Z Bouabdelli, S Belhadj, N Sadoun Smail .Options Méditerranéennes. Serie A, Séminaires Méditerranées, 159-162, 2016. Hua Li, Xiaoyu Wang, Peihong Li, Yong Li, Hua Wang. Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. Journal of Food and Drug Analysis, 16 (6), 67-73. 2008.

# *Annexes*

## Annexe 01

Tableau de matériel non biologique.

<b>Les verreries et petits matériels</b>	<b>Appareils</b>	<b>Les réactifs et les produits chimiques.</b>
Tubes à essai Entonnoire Micropipette Ver de montre Boîtes pétri Bec Bunsen Pipette Propipette Microplaques Ense de platine Eambeau Peinse Bécher Fiole	Étuve Autoclave Réfrigérateur Agitateur magnétique Balance Spectrophotomètre	Méthanol Milieu gélose Nutritif Milieu Muller Hinton Bouillon Nutritif Diméthyl sulfoxide (DMSO) chlorure de 2-3-5-triphényl-2H-tétrazolium (TTC)

## Annexe 02

Fiche technique de l'évaporateur rotatif BUCH / R-210.

Référence	BUC-23011A000
Affichage	Température, eau/huile.
Type d'évaporateur	Montorisé
Vitesse de rotation	20-280 Tour/ minute
Puissance absorbée	1360W
Taille de bille	50-4000ml
Poids maximum de la bille	3kg
Dimensions (LHP)	550X575X415mm
Poids	19-21kg avec bain
Volume du bain	4 litres
Plage de température du bain chauffant (LHP)	20-180°C
Pression	+/-2°C
Dimensions du bain chauffant (LHP)	285X240X300
Poids de ballon chauffant	4kg
IP de protection	IP 21
Conformité	CE
Alimentation	100-240V / 50-60Hz

### Annexe 3

#### Milieux de culture

##### Gélose nutritif

- 10 g de peptone ;
- 3 g d' extrait de viande ;
- 3 g d'extrait de levure ;
- 5 g de chlorure de sodium ;
- 18 g d' agar ;
- 1000 ml d'eau distillée .

##### Préparation

Dissoudre tout les composants dans une fiole de 3000 ml avec l'eau distillée et agiter le tout bien puis ajuster le pH à 6,7. Après ajouter le agar et autoclavé à 120°C pendant 20min.



**Figure 01 :** gélose nutritif préparer

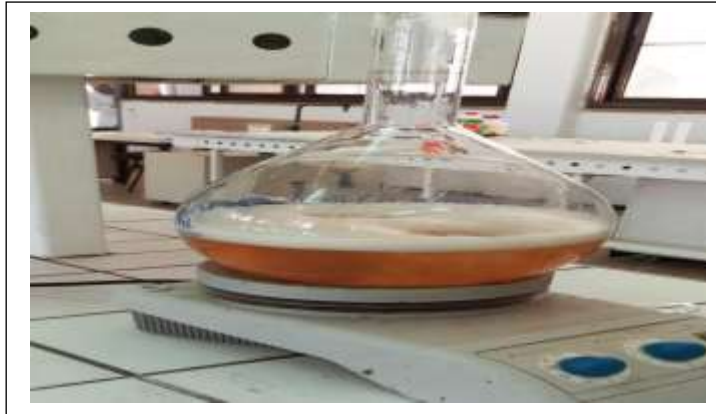
##### Gélose MH :

- 3 g d'extrait de viande;
- 17,5 g d'hydrolysate acide de caséine ;
- 1,5 g d'amidon ;
- 16 g d'agar ;
- 1000 ml d'eau distillée.

##### Préparation

Mettre 38 g de la mélange de ces ingrédients dans un fiole de 3000 ml avec l'eau distillée et agiter bien puis ajuster le pH à 6,7. Après autoclavé à 120 °C pendant 20 min.





**Figure 02:** gélose MH préparée.

### **Bouillon nutritif**

- 10 g de peptone;
- 1 g d'Extrait de viande ;
- 2g d'Extrait de levure ;
- 5g de chlorure de sodium ;
- 1 litre d'eau distillée.

### **Préparation**

Mettre 13 g de la mélange de ces ingrédients avec l'eau distillée et agiter bien puis ajuster le pH à 6,7. Après autoclavé à 120 °C Pendant 20 min.

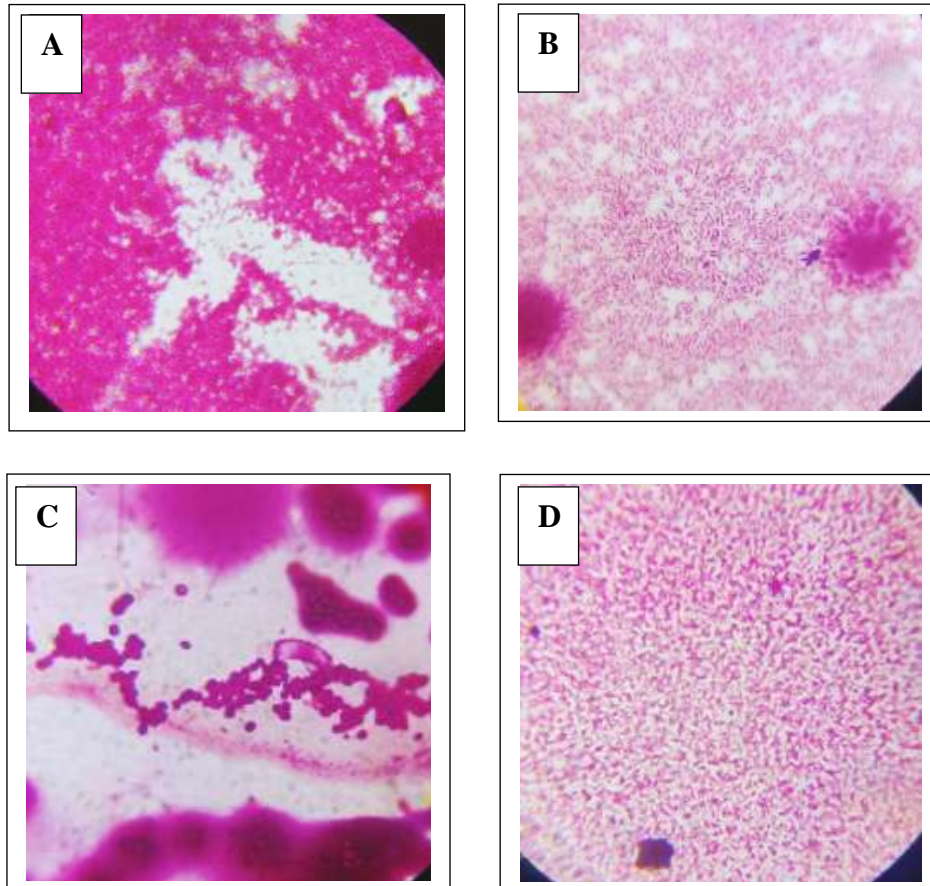
- 13 g de poudre de bouillon nutritif.
- 1 litre d'eau distillée .



**Figure 03 :** un litre de bouillon nutritif préparé

**Annexe 4**

Observations microscopiques des souches bactériennes cliniques



**Figure 04** : observations microplaques des souches clinique, (A : *Staphylococcus aureus* , B : *Escherichia coli*, C: *Candida albicans*, D : *Pseudomonas aeruginosa*)

**Annexe 05****Solution stérile de T.T.C.**

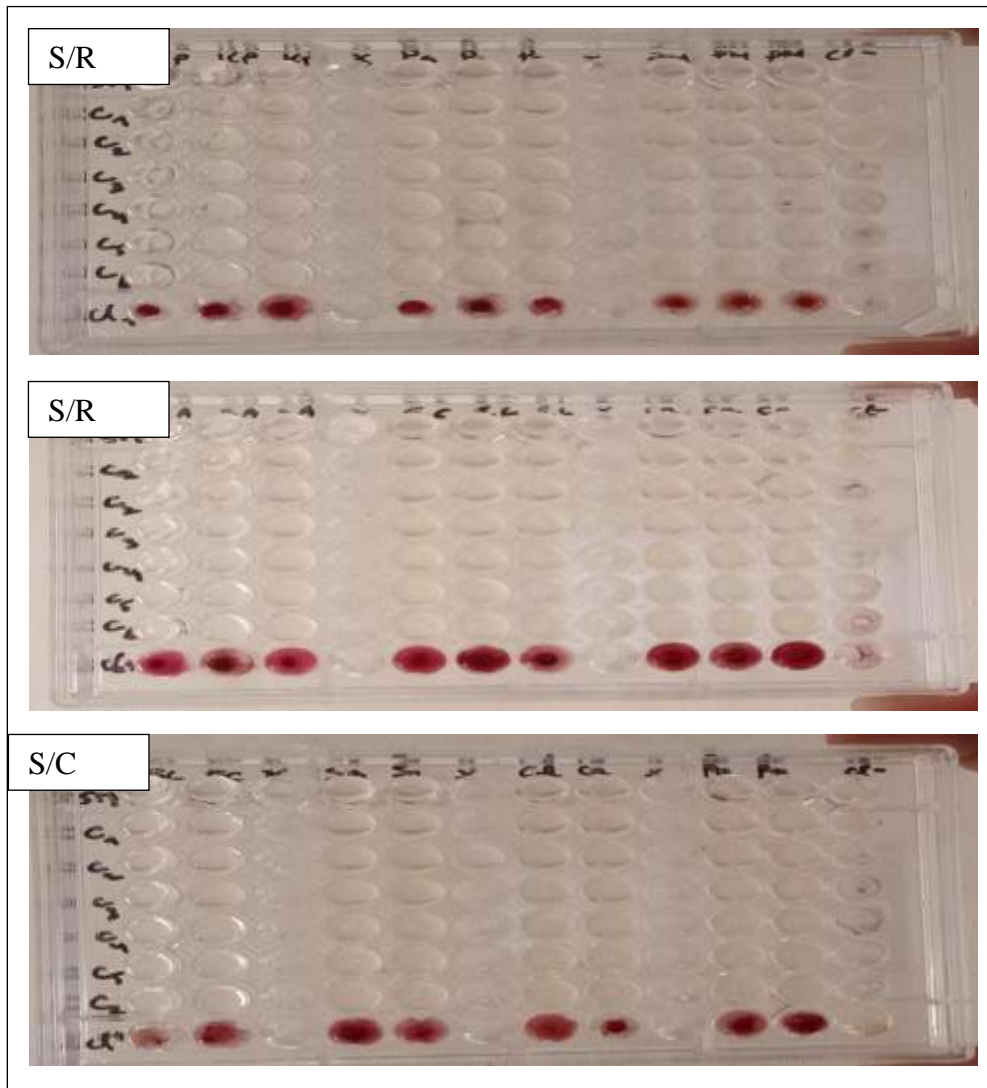
Formule 2-3-5 - chlorure de triphényle - 2H - tétrazolium + eau distillée

La concentration en TTC varie selon la formule

Conservation : Les tubes se conservent entre 2 et 8 °C à l'obscurité jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. Le TTC est photolabile et devient jaune sous l'effet de la lumière.

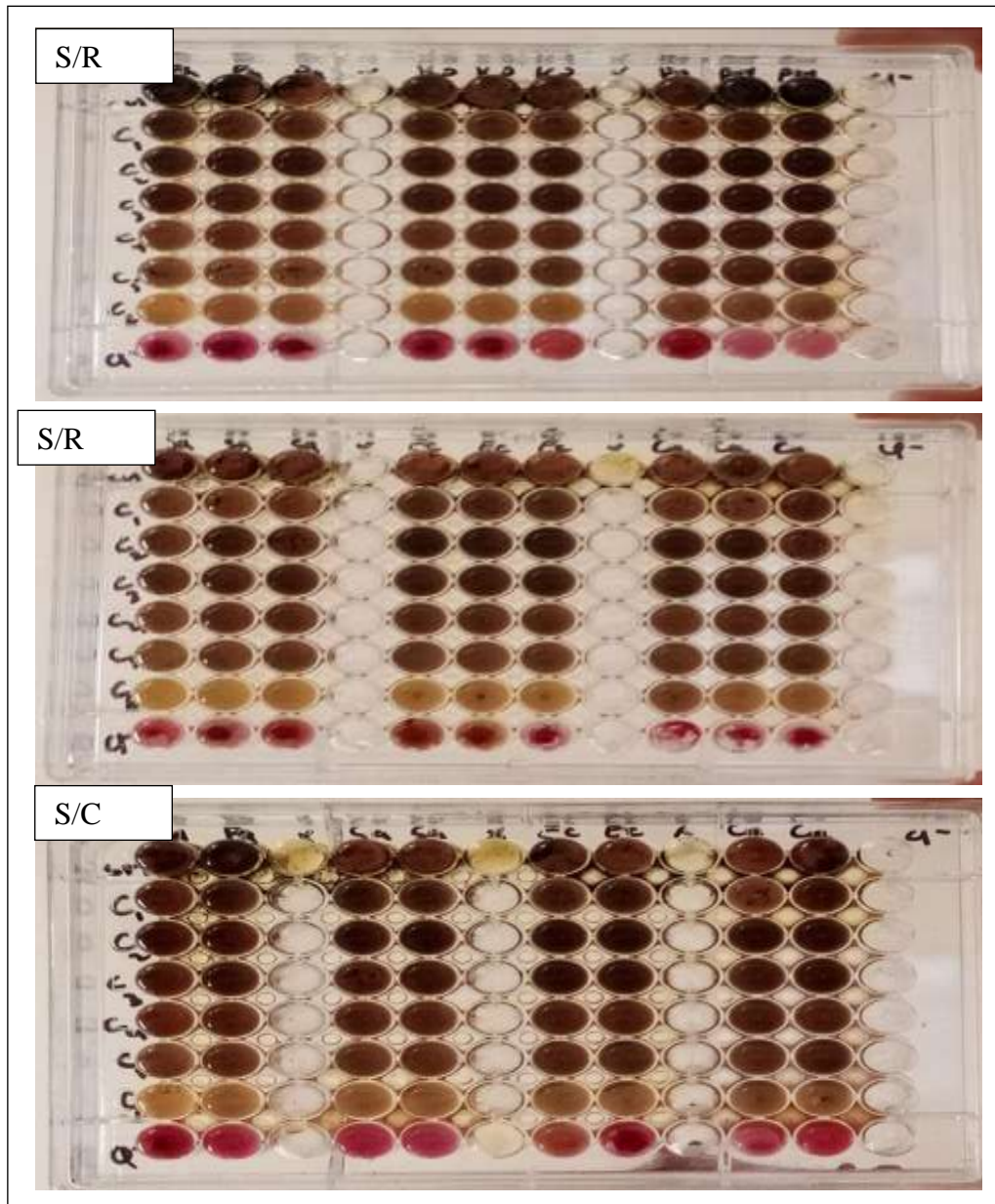
## Annexe 06

Les premiers résultats de CMI a concentration élevée (Figure 05 et 06)



**Figure 05:** détermination de concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle sur les souches référencées et cliniques ; Ec: Escherichia coli, Sa: Staphylococcus aureus, Ca: Candida albicans, Pa : Pseudomonas aeruginosa, PM : Proteus mirabilis, Kp : klebsiella pneumoniae, SM : solution mère.

Pour l'extrait



**Figure 06** : détermination de concentration minimale inhibitrice de l'extrait phénolique sur les souches référencées et cliniques ; Ec: Escherichia coli, Sa: Staphylococcus aureus, Ca: Candida albicans, Pa : Pseudomonas aeruginosa, PM : Proteus mirabilis, Kp : klebsiella pneumoniae, SM : solution mère.