REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L´ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DJILALI LIABES

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

SIDI BEL ABBES

Département de biologie

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : science biologique

Option : Biotechnologie microbienne

Présenté par

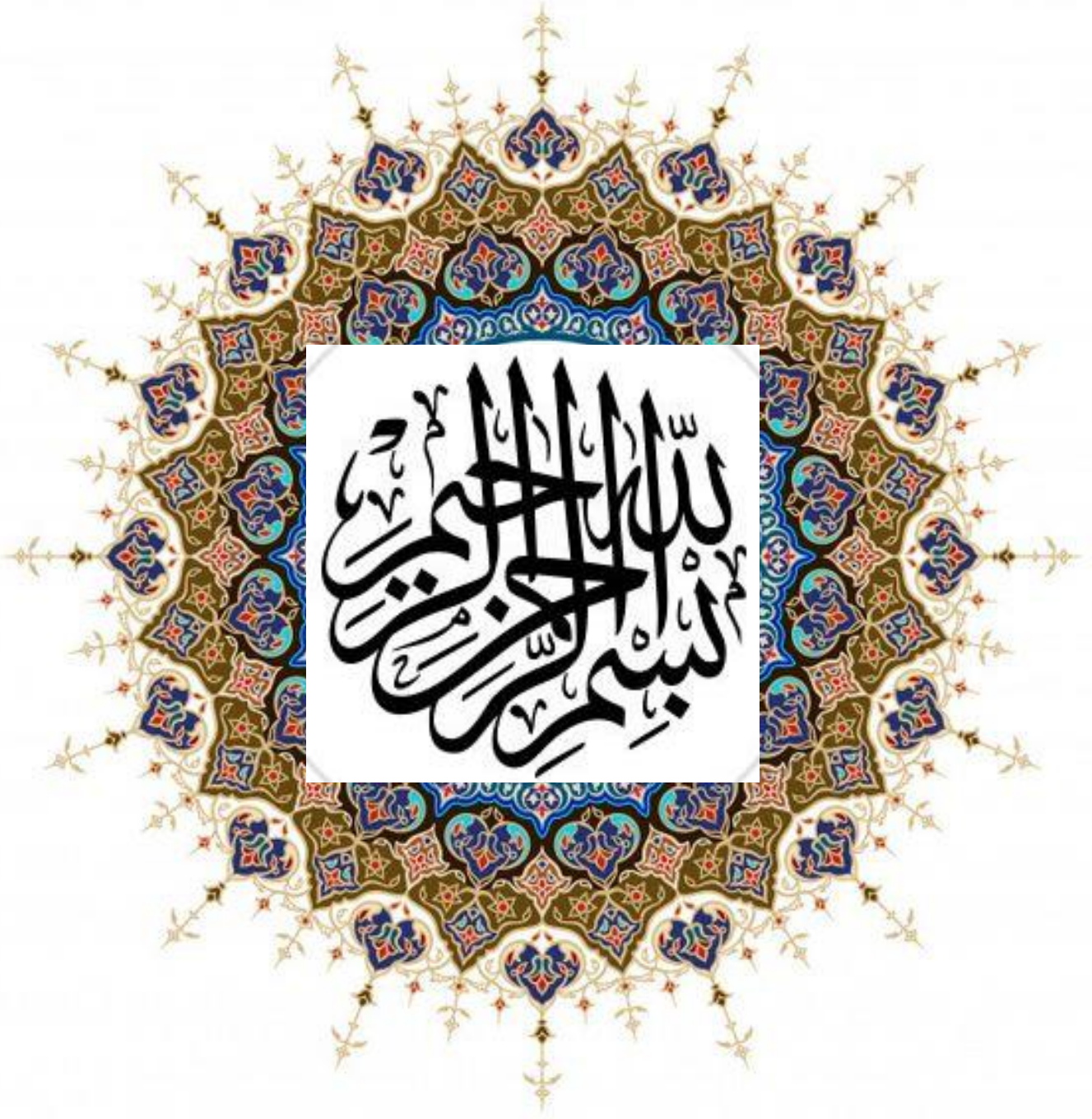
M^elle^ Nouar lamia **M ^elle^ Omrani souad**

Thème

ETUDE DE L'EFFET ANTIBACTÉRIEN DES EXTRAITS DE *THYMUS VULGARIS* ET *DE THYMUS SERPYLLUM* SUR LA CROISSANCE D'*ESCHERICHIA COLI* ; *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ET *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Dr. Kanoun . K	**(Présidente**	**MCA UDL / SBA)**
Dr. Zineddine .A	**(Examinatrice**	**MCA UDL / SBA)**
Dr. Chama. Z	**(Encadreur**	**MCB UDL / SBA)**

Année universitaire: 2020/2021


بسم الله الرحمن الرحيم

Remerciement

Avant tout, nous remercions « **ALLAH** » le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles afin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

J'ai l'honneur et le plaisir de présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à Notre encadreur Madame **CHAMA.Z** qui nous a dirigées avec une grande rigueur scientifique, sa patience, ses conseils, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour le temps qu'elle nous a consacré.

Nous remercions de tout cœur le responsable de parcours Monsieur le Professeur **ABBOUNI.B.** Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui vont juger notre recherche.
Nous remercions également les ingénieurs du laboratoire de recherche de l'Université Djilali Liabes faculté des Sciences de la Nature et de la vie.

Sont oublier tous les employées de la bibliothèque et les magasiniers de SNV pour leur aide et leur compréhension.

Une pensée particulière pour l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude et à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à l'achèvement de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail

A la personne la plus chère à mes yeux, à ma mère qui a tout sacrifié pour Ses enfants, qui a veillé à notre éducation, qui, sans elle je ne serai ce que je suis. Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Qu'ALLAH te protège et te donne la santé, le bonheur et longue vie.

A mon cher père, qui m'a toujours soutenu, et m'a été l'ami et conseiller et Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, Et ses encouragements. Que ce travail, soit pour vous, un faible témoignage de ma Profonde affection et tendresse. Qu'ALLAH le tout puissant te préserve, t'accorde Santé, bonheur et te protège de tout mal.

LAMIA NOUAR

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à

A mon très cher père Omrani Ahmed, pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi "papa". Tu m'as permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et tu m'as appris à ne jamais baissé les bras. Là où je suis arrivée aujourd'hui, c'est grâce à ton soutien et à tes encouragements. Puisse Allah le Tout puissant te préserver et t'accorder santé, longévité et bonheur.

"Merci papa"

A toi ma très cher mère, Djelaili Yamina, pour ton affection, ta patience, ton endurance, ta compréhension, ta disponibilité, ton écoute permanent et ton soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie. Tu es la source de ma réussite, car ce travail est le fruit de ta rigueur et de tes sacrifices pour mon éducation et ma formation. Je te dédie ce travail en te rendant hommage et en témoignant mon amour infini pour toi. J'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

"Merci maman"

A mes chères sœurs Farah et Saadia et ses enfant Rafik ; Ahmed et Malak pour leurs soutiens morals et leurs aides merci d'être là pour moi.

A mon frère zououi

A tout ma famille, mes tantes, mes ancles

A ma chère amie et binôme Lamia ainsi que sa famille, votre amitié est un honneur et une fierté pour moi. Je vous remercie pour les moments inoubliables que nous avons partagés ensemble, que notre amitié soit éternelle.

A Tous les membres de promo de Biotechnologie Microbienne 2020/2021 Que la paix d'ALLAH soit avec tous.

A ceux que j'ai eu la chance de connaître, dans les meilleurs et pires moments de ma vie.

Souad Omrani

Résumé

Le Thym est un arbrisseau appartenant à la famille des Lamiacées utilisé depuis l'antiquité en médecine traditionnelle. Les huiles essentielles possèdent d'importantes activités antimicrobiennes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants.

Dans ce contexte l'objectif de cette étude d'une part est d'étudier des propriétés physico- chimiques des huiles essentielles extraites à partir de 400gr de *T.vulgaris et T.serpyllum,* et d'autre part est de tester l'activité antibactérienne des ces huiles essentielles de sur les bactéries pathogènes (*Escherichia Coli* prélevée de l'urine infecté, *Staphylococcus aureus* prélève d'un produit laitier (lben) , *Pseudomonas aeruginosa* qu'on a apporter de chez laboratoire de CHU Abdelkader Hassani de Sidi Bel Abbes) par la méthode d'aromatogramme à des concentrations déférentes de HE de *T. vulgaris et T. serpyllum* de 10^{-1} à 10^{-7}.

L'extraction de ces huiles essentielles est réalisée par la méthode d'hydro distillation. Le rendement des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et de *Thymus serpyllum* sont de 1,5 % et 1,6% respectivement.

Les résultats obtenus ont montrés que les deux huiles essentielles ont une faible activité antibactérienne vis-à-vis *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* avec des diamètres d'inhibitions allant de 6 à 11 mm pour l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de 5,5 à 7mm pour l'huile essentielle de *Thymus serpyllum*. Par ailleurs aucune activité antimicrobienne n'a été enregistrée contre *Pseudomonas aeruginosa.*

Mots clés : *Thymus vulgaris, Thymus serpyllum,* huiles essentielle, activité antibactérienne, *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa.*

Abstract

Thyme is a shrub belonging to the Lamiaceae family used since antiquity in traditional medicine. Essential oils have important antimicrobial activities and can be a successful substitute for antibiotics which show their ineffectiveness against resistant microorganisms.

In this context, the objective of this study, on the one hand, is to study the physicochemical properties of essential oils extracted from 400gr of *T. vulgaris and T. serpyllum*, and on the other hand is to test the activity antibacterial of these essential oils on pathogenic bacteria (*Escherichia coli* taken from infected urine, *Staphylococcus aureus* taken from a dairy product (lben), *Pseudomonas aeruginosa* that we brought from the laboratory of CHU Abdelkader Hassani of Sidi Bel Abbes) by the aromatogram method at deferent concentrations of ET from *T. vulgaris* and *T. serpyllum* from10^{-1} to 10^{-7}.

The extraction of these essential oils is carried out by the hydro distillation method. The yield of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Thymus serpyllum* are 1.5% and 1.6% respectively.

The results obtained showed that the two essential oils have a weak antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with diameters of inhibitions ranging from 6 to 11 mm for the essential oil of *Thymus vulgaris* and 5.5 at 7 mm for the essential oil of *Thymus serpyllum*. Furthermore, no antimicrobial activity has been recorded against *Pseudomonas aeruginosa.*

Key words: *Thymus vulgaris, Thymus serpyllum,* essential oils, antibacterial activity, *Escherichia coli, Staphylococcus aureus ,Pseudomonas aeruginosa.*

ملخص

ينتمي زعتر الى عائلة شجيرة الزعتر والتي استخدمت منذ زمن قديم في الطب التقليدي.للزيوت الأساسية المستخلصة فوائد بيولوجية مهمة ضد الجراثيم لان المضادات الحيوية أصبحت لا تجدي نفعا ضد الجراثيم المقاوم

الهدف من عملنا من جهة دراسة الخصائص الفيزيائية الكيميائية للزيوت الأساسية المستخلصة من أربعة مئة غرام منوعين من هذه النبتة

من)*Thymus vulgaris et Thymus serpyllum* ومن جهة أخرى يعتمد على تقييم تأثير هذا الزيت العطري بتقنية اروماتوغرام على نمو *Escherichia coli* المأخوذة من اليوريا و المكورات العنقودية الذهبية المأخوذة من اللبن و *Pseudomonas aeruginosa* التي جلبناها من مخبر المستشفى الجامعي عبد القادر الحساني بسيدي بلعباس.

الهدف من عملنا من جهة دراسة الخصائص الفيزيائية الكيميائية للزيوت الأساسية المستخلصة من أربعة مئة غرام انوعين من هذه النبتة

تقييم تحليل الزيت العطري) االساسي(من *Thymus vulgaris*و *Thymus serpyllum*

واختبار النشاط المضاد البكتيري للزيوت االساسية على نمو البكتيريا (*Escherichia coli.(Pseudomonas aeruginosa ; Staphylococcus aureus*استخراج الزيت العطري االساسي باستخدام تقنية التقطير المائي

بينت النتائج التحليل الكمي للزيت االساسي لكل من *Thymus serpyllum*و*Thymus vulgaris*

ان مردودهما بلغ 1.5% و 1.6% على الترتيب .

من خالل نتائج اختبار النشاط المضاد البكتيري للزيوت االساسية على نمو البكتيريا تبين ان المستخلصين الزيتيين ليس لهما تأثير قوي *Staphylococuus aureus* و *E. coli* حيث تتراوح أقطار كبح ّنمو البكتيريا من 6 الئ 11 مم بالنسبة ل *Thymusvulgaris*

من5.5الئ7مم بالنسبة ل *Thymus serpyllum*

بالنسبة ل اما*Pseudomonas aeruginosa*، لم يظهر أي تأثير للمستخلصين على نمو هذه البكتيريا حيث بلغ قطرها 0مم.

الكلمات المفتاحية

النشاط المضاد البكتيري; الزيت العطري(االساسي); تقنية التقطير المائي

Escherichia coli ; المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus ; Pseudomonas aeruginosa ;aureusThymus vulgaris et Thymus serpyllum* ;اروماتوغرام;اليوريا.

Liste des Abréviations

HE: Huile essentielle.

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

T.serpyllum* :** *Thymus serpyllum.**

***E.coli* :** *Escherichia coli.*

MTR : Médicine traditionnelle.

% : Pourcentage.

°C : Degré Celsius.

PAM : Plantes aromatique médicinales.

%: Pourcentage**.**

C : Atome deCarbone**.**

PPI3 : Isopenténe-3-yle.

PPI2 : Isopenténe-2-yle.

ATP : Adénosine triphosphate

CO_2 : Dioxyde de carbone

µm : Micromètre

nm: Nanomètre

mm : Millimètre

KOH : Hydroxyde de sodium

g: Gramme

ml: Millilitre

RHE : Rendement d'huile essentielle

MHE : Masse d'huile essentielle

IR : Indice de refraction

Raie D du soduim : Rraie doublet du soduim

pH: Potentiel d'Hydrogène

IA : Indice d'acide

N : Normalité

IS: Indice de saponification

H_2SO_4: Acide sulfurique

V : Volume

m : Masse

mg: Milligramme

IE : Indice d'ester

SBA : Sidi Bel Abbes

CHU : Centre hospitalier universitaire

h: Heure

ECBU : Examen Cytobactériologique des Urines

Test TSI: Test Triple Sugar Iron

UFC/ml : Unité faisant colonies par millilitre

µl : Micro litre

min: Minute

MH : Mueller Hinton

D : Diamètre de zone

GN : Gélose nutritifs

BN : Bouillon nutritif

Listes des figures

Figure 01 : Acide cinamique (9)..... **6**

Figure 02 : Acide benzoïque (9)..... **6**

Figure 03 : Structure de base des flavonoïdes..... **6**

Figure 04 : Structure d'une molécule de coumarine (19). **7**

Figure 05: Classes des constituants chimiques des huiles essentielles (52)..... **13**

Figure 06 : Condensation de type claisen entre deux molecules d'acetylCoA pour conduire à l'acetoacetylCoA..... **14**

Figure 07 : Réactiond'aldolisation entre une 3ème molecule d'acetylCoA et l'acetoacetylCoA.. ..... **14**

Figure 08 : Deux intermédiaires PPI3 et PPI2 réagissent entre eux pour générer le pyrophosphate de géranyle (PPG) **14**

Figure 09 : Représente voie non mévalonique ou la voie du méthylérythritol phosphate. **15**

Figure 10 : Exemple de synthèse des dérivés du phénylpropane. **15**

Figure 11 : Représente montage d'hydro-distillation..... **17**

Figure 12 : Schéma du principe de la technique d'extraction par hydro-diffusion (67). **17**

Figure 13 : Schéma du principe de la technique d'extraction par entrainement à la vapeur (64). **18**

Figure 14 : Schéma du principe de la technique d'extraction par solvant organique (69)..... **19**

Figure 15 : Représente montage d'extraction par enfleurage **20**

Figure 16 : Technique d'extraction a froid(62). **20**

Figure 17 : Schéma du principe de la technique d'extraction par CO2 supercritique (74).... **21**

Figure 18 : Dispositifs d'extraction assistée par micro-ondes. **22**

Figure 19 : Représente *Thymus Vulgaris.* **29**

Figure 20 : Représente *Thymus serpyllum.* **31**

Figure 21 : Représente coloration de gram (positive et négative). **31**

Figure 22 : Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram-positives (A) et Gram négatives (B)..... **34**

Figure 23 : Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* (113 ; 114)..... **35**

Figure 24 : Observation microscopique *de Pseudomonas aeruginosa.* **37**

Figure 25 : Observation microscopique d'*Escherichia coli* (120). **38**

Figure 26 : Représente la pesée de matière sèche **43**

Figure 27 : Représente l'appareil clevenger..... **43**

Figure 28 : Boite des papiers pH..... **44**

Figure 29 : Représente appareil de saponification le réfrigérant. **46**

Figure 30 : Représente pesé d'HEs de *T.vulgaris et T.serpyllum.* **46**

Figure 31 : Représente agitation de KOH alcoolique **46**

Figure 32 : Virage de couleur après l'ajout de phenolophtaleine. **47**

Figure 33: Titrage des HEs par l'acide sulfurique H_2SO_4. ..... **47**

Figure 34 : Galerie classique destests biochimiques d'*E. Coli* (Témoin). **50**

Figure 35 : Préparation des suspensions bactériennes. **52**

Figure 36: Représente incubation des suspensions bactériennes à 37°C pendant24h. **52**

Figure 37 : Représente centrifugation des suspensions 4000tr à 15min. **53**

Figure 38: Préparation des boites pétries en coulant MH **53**

Figure 39 : Stérilisation de tween 80 à 120°C pendant 15min..... **54**

Figure 40 : Agitation de solution mère (tween 80 avec huile) au vortex. **54**

Figure 41 : Représente dépôt des disques stériles à la surface des boites pétries ensemencé.**55**

Figure 42 : Incubation les boite apres le dépot des diques à 37°C pendant 24h. **55**

Figure 43 : Principe de la méthode de diffusion par disque (124). **55**

Figure 44 : Extraction d'huile de *T. serpyllum.* **57**

Figure 45 : Extraction d'huile de *T.vulgaris.* **57**

Figure 46 : Résultats de pH. **57**

Figure 47 : Représente résultat de saponification (virage de couleur). **58**

Figure 48 : Représente aspect macroscopique *d'Escherichia coli* sur Hektoen. **58**

Figure 49 : Représente aspect macroscopique d'*Escherichia coli* sur GN **59**

Figure 50 : Bacilles Gram négatif (coloration de Gram). **59**

Figure 51 : Test de catalase positif..... **60**

Figure 52 : Représente aspect du milieu TSI (test positif)..... **60**

Figure 53 : Représente aspect du milieu mannitol-mobilité (test positif)..... **61**

Figure 54 : Represente aspect du milieu citrate de Simmons (test négatif). **61**

Figure 55 : Résultats d'enrichissement sur milieu GC pendant 24 h à 37°C..... **62**

Figure 56 : Résultat positif d'ensemencement par des stries sur gélose Chapman..... **62**

Figure 57 : Purification sur BN..... **63**

Figure 58 : Observation d'un isolat sous Microscope Optique G X100. ..... **63**

Figure 59 : Test de catalase positif..... **64**

Figure 60 : Résultat de test TSI positif (A) avant incubation, (B) après incubation..... **64**

Figure 61 : Résultats du test CS, (A) : Avant incubation, (B) Après incubation. **65**

Figure 62 : Résultats des suspensions bacteriennes (A) *E.coli* (B) *Staphylococcus aureus* (C) *Pseudomonas aeruginosa* **65**

Figure 63 : Résultats des suspensions après l'incubation. **66**

Figure 64 : Dilutions de 10^{-1} jusqu'à 10^{-6}(A) *T.vulgaris* (B) *T.serpyllum.*..... **66**

Figure 65 : Représente les résultats d'aromatogramme de *T.serpyllum*(A) *Staphyloccocus aureus* ; (B) *Pseudomonas aeruginosa* ET (C) *E.coli.*..... **67**

Figure 66 : Représente les résultats d'aromatogramme de *T.vulgaris*(A) *Staphyloccocus aureus* ; (B) *Pseudomonas aeruginosa* ET (C) *E.coli.*..... **68**

Liste des tableaux

Tableau 01: Représente la classification de *Thymus vulgaris* ..... ……**29**
Tableau 02: Représente la classification de *Thymus serpyllum* ……....**32**
Tableau 03: Classification classique de *Staphylococcus aureus*……..**36**
Tableau 04: Classification classique du *Pseudomonas aeruginosa*..... **37**
Tableau 05: Représente la classification classique d'*E.coli* **39**
Tableau 06: Représente le taux de rendement des HEs de *T.vulgaris et T.serpyllum* **56**
Tableau 07: Caractéristiques organoleptique d'HE de *T.vulgaris et Tserpyllum* **56**
Tableau 08: Représente la valeur de pH des HEs de *T.vulgaris et T.serpyllum* **57**
Tableau 09: Caractéristiques chimiques des HEs de *T.vulgaris et T.serpyllum* **57**
Tableau 10: Résultats d'arommatograme de *T.serpyllum*..... **67**
Tableau 11: Résultats d'aromatogramme de *T.vulgaris* **68**

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figurée

Liste des tableaux

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralité sur les plantes médicinales et aromatique

Définition de la plante médicinale aromatique 3

Définition de la phytothérapie 3

L'aromatherapie 4

Principe actifs 4

Métabolite primaire 4

Métabolite secondaire 5

Les composés phénoliques Les composés phénoliques ou les polyphénols (PP) 5

Les flavonoïdes 6

Poly phénols sous forme de polymères 6

Les coumarines 6

Les tannins 7

Les alcaloïdes 8

Les terpénoïdes 8

Cueillait et séchage 9

Conservation et stockage 9

Chapitre II : les huiles essentielles

Définition **10**

Localisation **10**

Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles **11**

Composition chimique des huiles essentielles **11**

Les terpene et les Terpénoides **11**

Les composés aromatiques **12**

Biogenèse des composés des huiles essentielles **13**

Voie des terpénoïdes **14**

La voie des phénylpropanoides (composés aromatiques) **15**

Les facteurs influençant la composition chimique **15**

Méthodes d'extraction des HE **16**

Distillation **16**

Hydro-distillation ou clevenger **16**

Hydro diffusion **17**

Entrainement à la vapeur d'eau **17**

Extraction par solvants volatils **18**

Extraction par enfleurage **19**

Extraction à froid **20**

Extraction a CO2 supercritique **20**

Extraction par micro-ondes **21**

Activités biologiques des huiles essentielles **22**

Activités antioxydants **22**

Activités antibactériennes **22**

Activités antifongiques **23**

Activités anti-inflammatoires **23**

Activités antivirales **23**

Activité antiseptique **23**

Activité antiparasitaire **23**

Domaines d'utilisation des huiles essentielles **24**

En pharmacie **24**

En cosmétologie **24**

En industries agroalimentaires **24**

En agriculture **24**

Toxicité des huiles essentielles **25**

Conservation des huiles essentielles **25**

Etiquetage **26**

Chapitre III : Généralité sur *Thymus vulgaris* et *Thymus serpyllum*

Généralité **27**

Généralité sur la famille des lamiacées **27**

Habitat et Culture **27**

Principe actif de thym **28**

Huile essentielle **28**

Thymus vulgaris **28**

Description botanique **28**

Classification **29**

Propriétés thérapeutiques et usages **30**

Propriétés thérapeutiques **30**

Usage traditionnel et courant **30**

En cuisine **30**

En thérapeutique **30**

En usage local **30**

Usage de l'huile essentielle 30

Thymus serpyllum **31**

Description morphologique **31**

Classification **32**

Utilisation therapeutique **32**

Chapitre IV : Généralité sur les bactéries pathogènes

Généralités sur les bactéries 33

Structure des bacterie Gram positif et gram negatifs 34

Bactéries à gram positif **35**

Staphylococcus aureus **35**

Caractère bactériologique **35**

Habitat **35**

Classification **36**

Pouvoir pathogène **36**

Bactérie à gram négatifs **36**

Pseudomonas aeruginosa **36**

Caractère bactériologique **36**

Habitat **37**

Classification **37**

Pouvoir pathogène **38**

Escherichia coli **38**

Caractère bactériologique **38**

Habitat **38**

Classification **39**

Pouvoir pathogène **39**

Partie expérimentale

Chapitre V : Matériels et méthodes

Objectifs de travail **40**

lieu de stage **40**

Appareillage **40**

Matériels **40**

Produits utilisé **41**

Matériels végétaux **41**

Matériels microbiologique **41**

Les germes testés **41**

Réactifs chimiques **41**

Milieux de base **41**

Matériel biologique **41**

Récolte de la matière **42**

Séchage des plantes **42**

L'extraction d'HE de *T.vulgaris et de T.serpyllum*……..……..…..43

Analyse Quantitative **43**

Rendements **43**

Analyse qualitative **44**

Caractérisation organoleptique **44**

Détermination des propriétés physico-chimiques **44**

Les propriétés physiques **44**

L'indice de réfraction. **44**

Le pH **45**

Propriétés chimiques **45**

L'indice d'acide **45**

L'indice de saponification **47**

L'indice d'ester **47**

La densité **47**

La densité relative **47**

Isolement et identification des souches pathogènes **48**

Prélèvement d'*E.coli* **48**

Chez les sujets coopératifs **48**

Chez les sujets non coopératifs **48**

Transport des urines **48**

Ensemencement **48**

Isolement et purification **48**

Techniques utilisées pour l'identification des bactéries **48**

Examen macroscopique **48**

Examen microscopique **48**

Coloration de Gram **49**

Test biochimique **49**

Prélèvement de *Staphyloccocus aureus* **50**

L'enrichissement **50**

Isolement **50**

Purification des isolats **50**

Etude macroscopique **51**

Etude microscopique **51**

Coloration de Gram **51**

Test biochimique **51**

Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. vulgaris et T. serpyllum* sur la croissance des bactéries pathogènes. **51**

Technique d'aromatogramme sur milieu solide **51**

Préparation de la suspension bactérienne **52**

Préparation des milieux de culture **53**

Préparation des différentes concentrations d'HE **53**

Préparation des disques d'HE de *T. vulgaris et T. serpyllum* 54

Ensemencement 54

Dépôt des disques 54

Expression des résultats 55

Chapitre VI : Résultat et discussion

Analyse quantitative 56

Rendement en huile essentielle 56

Analyse qualitative 56

Caractère organoleptique 56

Caractéristiques physico-chimiques 57

Isolement et identification des souches pathogènes 58

Tests préliminaire d'*Ecoli* 58

Examen macroscopique 58

Sur milieu Hektoen 58

Sur milieu GN 59

Aspect microscopique 59

Coloration de Gram 59

Galerie classique 60

Test de catalase 60

Test TSI 60

Utilisation de mannitol et test de mobilité 61

Recherche de l'utilisation de citrate 61

Enrichissement de *Staphyloccocus Aureus* 62

Isolement de *Staphyloccocus aureus* 62

Purification de *Staphyloccocus aureus* 63

Examen microscopique 63

Coloration de Gram 63

Galerie biochimique 64

Test de catalase **64**

Test TSI **64**

Test Citrate de Simmons **65**

Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. vulgaris et T. serpyllum* sur la croissance des bactéries pathogènes. **65**

Technique d'aromatogramme sur milieu solide **65**

préparation des suspensions **65**

Ensemencement **66**

Résultats Préparation des différentes concentrations d'HE **66**

Résultat dépôt des disque **67**

Discussion **69**

Conclusion **71**

Référence bibliographique **73**

Annexe **87**

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

Les plantes médicinales sont devenues importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque leurs constituants sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse des médicaments (**98**). elles représentent une source inépuisable de remèdes traditionnelle et efficaces grâce aux principes actifs qu'elles contiennent : (alcaloïdes, flavonoïdes, hétérosides, , quinones, vitamines,… et huile essentielles) en effet , les HES ont été utilisées depuis l'antiquité et sont largement employées de nos jours, pour leurs propriétés biologiques (antimicrobienne, antioxydant, analgésique , anti inflammatoire, anti-cancérigène, antiparasitaire, insecticide…) et leurs applications dans de multiples et divers industries : (alimentaires, cosmétique, parfumerie et pharmacie **(140).**

L'aromathérapie ou l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques est en expansion en France. Elle s'affirme comme une thérapeutique complémentaire dans le conseil officinal. Elle permet l'harmonisation de la santé physique et mentale.

Il est préférable d'utilisé aromathérapie pour les infections microbiennes car l'usage extensif des antibiotiques dans la médication humaine et dans l'élevage des animaux a conduit à la sélection des souches microbiennes résistantes **(105 ; 123)** Et pour cette raison les recherches sont orientées vers des agents thérapeutiques efficaces et avec le moins d'effets secondaires possible.

Le Thym En raison de sa saveur aromatique, est provoqué une stimulation réflexe des sécrétions salivaires, gastriques et biliaires. Il est ainsi utilisé pour ses propriétés régulatrices de l'appétit et comme stimulant digestif, cicatrisantes, vermifuge, antiseptique. Des extraits de thym ainsi que son huile essentielle sont fortement antimicrobiens. Tous les chimiotypes sont actifs, mais l'activité bactéricide est plus marquée pour les types à thymol et à carvacrol**(139).**

L'objectif de notre travail vise en particulier à étudier l'effet antibactérien des huile essentielles de *T.vulgaris et T.serpyllum* sur le germe *Escherichia coli ; Staphylococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa.*

Des méthodes microbiologiques et biochimiques ont été utilisées lors de cette étude :

- Extraction des huiles essentielles de *T.vulgaris et T.serpyllum* par la méthode d'hydro-distillation.
- Détermination des propriétés chimique des HEs.
- Isolement et identification des bactéries pathogènes.
- Evaluation de l'effet antibactérien des extraits de *T.vulgaris et T.serpyllum* vis à vis aux bactéries pathogène

Partie Bibliographique

Chapitre I:
Généralité sur Les plantes médicinales aromatiques

I. Définition de la plante médicinale aromatique

Les plantes médicinales sont utilisées pour leurs propriétés particulières Bénéfiques pour la sante humaine, En effet, elles sont utilisées de différentes Manières, décoction, macération et infusion. Une ou plusieurs de leurs parties peuvent être utilisées, racine ; feuille, fleur (**1).** Ce sont des plantes utilisées en Médecine traditionnelle (MTR) dont au moins une partie possède des propriétés Médicamenteuses.

Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents **(2).**

II. Définition de la phytothérapie La phytothérapie ou bien la thérapie par les plantes

La phytothérapie est une discipline qui étudie les plantes médicinales donc est une façon de mettre à profit les propriétés médicinales des végétaux en utilisant les plantes sous forme de préparations dites "galéniques" afin de soigner ou de prévenir les maladies **(3).** On peut la distinguer en trois (3) types de pratiques : **(4).**

• Une pratique traditionnelle

Cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est le plus souvent une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique.

• Une pratique basée sur les avancées et preuves scientifiques qui recherchent des extraits actifs dans les plantes.

Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique débouche suivant les cas sur la fabrication de médicaments pharmaceutiques ou de phytomédicaments, et selon la réglementation en vigueur dans le pays, leur circulation est soumise à l'autorisation de mise sur le marché pour les produits finis, et à la réglementation sur les matières premières à usage pharmaceutique (MPUP) pour les préparations magistrales de plantes médicine de plantes médicinales, celles-ci étant délivrées exclusivement en officine. On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique

• **Une pratique de prophylaxie** déjà utilisée dans l'antiquité. Nous sommes tous phytothérapeutes sans le savoir : c'est notamment le cas dans la cuisine, avec l'usage de la ciboulette, de l'ail, du thym.

III. L'aromathérapie

Le mot « Aromathérapie » issu du latin « *aroma* : odeur » et du grec « *therapein : soin* » fut inventé en 1928 par le chimiste français René-Maurice Gattefossé Cusson **(5).**

l'aromathérapie scientifique médicale est définie comme état l'utilisation d'Huiles Essentielles chémotypées, c'est a dire de composition biochimique bien connue, par voie cutanée, orale, vaginale, rectale, nasale, auriculaire et olfactive afin d'assurer un complément de soin ou un soin préventif ou curatif d'un large panel d'affections chez l'homme, l'animal et la plante, tant au niveau de la destruction des foyers infectieux pathogènes que de la gestion des troubles symptomatiques, organiques ou fonctionnels de ladite affection **(6).**

IV. Principe actifs

Les principes actifs d'une plante médicinale sont les composants biochimiques naturellement présents dans une plante, ils lui confèrent son activité thérapeutique.

Les principes actifs trouvent dent toutes les parties de la plante, mais de manière inégale et ils n'ont pas les mêmes .En effet, à coté des métabolites primaires classiques, glucides, protides, lipides, ils accumulent fréquemment des métabolites secondaires. Ces derniers, représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différent quel pharmacologie ou l'agroalimentaire **(7).**

1 : Métabolite primaire

a. Glucide ou hydrate de carbone : Ce sont des composés organiques carbonylés poly hydroxylés. Ils représentent pour les végétaux :

- **Un moyen de stockage de l'énergie solaire** : ils forment le groupe le plus important, sous forme de polymères (amidon)
- **Des éléments de soutien** : ils participent à la structure du végétal (cellulose...) ; constituants de métabolites (les enzymes, acides nucléiques, hétérosides …)
- **Des précurseurs des autres métabolites (8).**

b. Les lipides : sont des substances naturelles, constituées d'esters d'acides gras et d'un alcool ou d'un polyol. Appelés aussi des corps gras

- Ce sont des substances hydrophobes et parfois amphiphiles, solubles dans les solvants organiques polaires et apolaires et sont non volatils.
- Ils rentrent dans les constituants de structures cellulaires tels les glycolipides, les phospholipides membranaires, ils peuvent aussi être des éléments de revêtement comme les cires ou les cutines, mais aussi des substances de réserves, sources d'énergies **(8).**

c. **Les protéines :** sont Constituées principalement d'acides aminés, elles jouent un rôle fonctionnel (les enzymes) et un rôle dans la structure du végétal. Le rôle diététique des protéines végétales est loin d'être négligeable mais également leur utilisation en pharmacie aussi bien dans le domaine médicale ou industriel (chimique ou agroalimentaire **(8).**

2 : Métabolite secondaire

Les métabolites secondaires (SM) sont présents dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine. Ils présentent une énorme valeur économique (en particulier pour l'industrie pharmaceutique et la cosmétique **(9).**

a. **Les composés phénoliques Les composés phénoliques ou les polyphénols (PP)**

Sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction **(10).**

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétylcoenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe ou d'un tissu particulier **(11).**

a. **1 Polyphénols monomériques**

a. **1 .1 Les acides phénoliques**

- Ces composés sont dérivés de deux sous groupes distingués :
  Les acides hydroxycinnamiques **(figure 1)** dont les plus abondants sont l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide chlorogenique et les acides hydroxybenzoïque **(figure2),** mais les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique.
- Sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales et présents chez toutes les céréales **(12).**
- Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prebiotique, antioxydant, de chélation et anti-inflammatoire.
- Leur toxicité est très faible car ils sont considérés non toxiques **(12).**

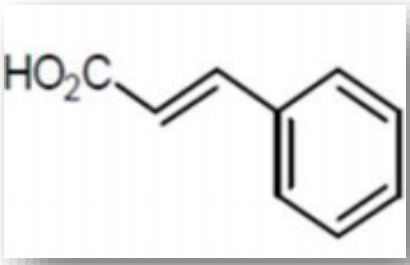


Figure1 : Acide cinamique (**9**)

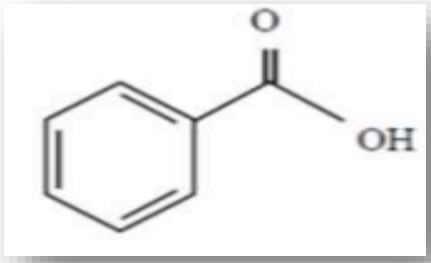


Figure 2: Acide benzoique (**9**)

a. 1 .2 : Les flavonoïdes

- Le terme flavonoïde (de flavus, ‹‹jaune›› en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols **(figure 10) (13).**
- Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux **(14).**
- Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides
- On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires **(15).** où ils peuvent être localisés dans divers organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits et jouent un rôle important dans la protection des plantes **(12).**
- Les flavonoïdes se trouvent également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant ces composés sont utilisés en médecine traditionnelle à travers le monde entier **(12).**

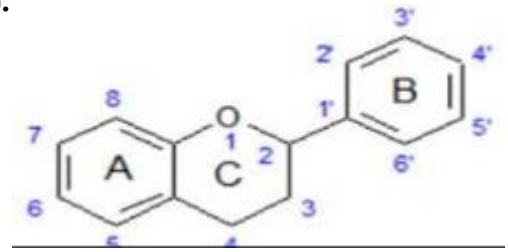


Figure03 : Structure de base des flavonoïdes **(17).**

b. Poly phénols sous forme de polymères

b. 1 Les coumarines

Tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de fève tonka dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine.

- Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels, elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraichement fauché, a l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien, les familles les plus riches en coumarines sont : Légumineuse, Rutacées, Apiécées et Thymeleacées.
- Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines **(17).**
- Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycolysée **(18).**
- Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

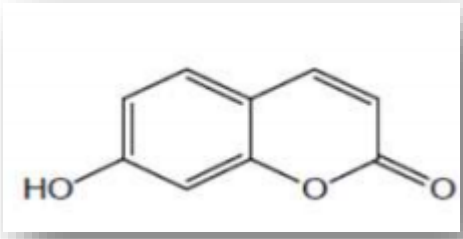


Figure 04: Structure d'une molécule de coumarine **(19).**

b. 2 Les tannins

D'un point de vue biochimique, une première définition a été proposée par BateSmith, (1973) c'est que les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3000 Da **(20).**

- Les tannins se caractérisent par leur faculté à se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que des glucides, des acides nucléiques, des stéroïdes et des alcaloïdes pour former un précipité **(12).**
- Ils sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacée, les Rosacée **(21).**
- Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les grains **(22).** En général, ils sont subdivisés en deux groupes distincts en fonction du type

de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule **(23).**

b. Les alcaloïdes

- Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale a caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe **(24).**
- Généralement, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Puis, ils gagnent ensuite des lieux différents et, lors de ces transferts, ils peuvent subir des modifications.
- Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles **(25).**
- Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques **(26).**

Les alcaloïdes possèdent des effets thérapeutiques variés :

- **Action dépressive** (morphine, scopolamine…) ou **stimulante** (caféine, strychnine) sur le système nerveux centrale
- **Action sympathomimétique** (éphédrine) ou **sympatholytique** (yohimbine, certains alcaloïdesde l'ergot de seigle), **parasympathomimétique** (physostigmine, pilocarpine), **anti cholinergique** (atropine, hyoscyamine) ou **ganglioplégique** (nicotine, spartéine) sur le système nerveux autonome.
- **Action curarisante**, **anesthésique locale** (cocaïne).
- **Action antifibrillante** (quinidine).
- **Action anti tumorale** (vinblastine, ellipticine), **antipaludique** (quinine) et **amoebicide** (émétine).

Ce qui conduit à une large utilisation des plantes à alcaloïdes dans différents traitements soit sous forme de préparations galéniques ou comme matières premières pour les extractions industrielles, mais un usage qui reste délicat suite à leurs puissants effets **(8).**

c. Les terpénoïdes

- Le terme terpène inventé par Kekulé, vient de leur origine historique de l'arbre de térébinthe : «PistaciaTerebinthus» **(27).**
- Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale **(28).**

- Synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux **(29).**
- L'exploitation de ces composés s'effectuait sous forme d'huiles extraites de plantes (huiles essentielles) par le moyen de la distillation **(28).**

III. Cueillait et séchage

Les propriétés des plantes dépendent essentiellement de la région de production, période et techniques de cueillette, La cueillette est liée avec la variation climatique et saisonnière. Pour déterminer les propriétés d'une plante.il est nécessaire de prendre en considération la partie utilisée, morphologie, couleur, nature, saveur

Le séchage au soleil est la méthode la plus simple et économique, utilisé surtout pour les racines, tiges, graines et fruits. Le séchage à l'ombre est indiqué pour les feuilles et fleurs, car les feuilles vertes séchées au soleil jaunissent, les pétales de fleurs perdent leurs couleurs vives, ce qui peut altérer les propriétés médicinales de ces produits. Les plantes aromatiques ne doivent pas rester trop longtemps au soleil pour ne pas perdre leur parfum **(29).**

Le maximum de température admise pour une bonne dessiccation des plantes aromatiques ou des plantes contenants des huiles essentielles est de 30°C ; pour les autres cas, la température de dessiccation peut varier de 15 à 70°C **(30).**

IV. Conservation et stockage

Les PAM sont conservées à l'abri de la lumière, air et au sec dans des récipients en porcelaine, faïence ou verre teinté, boites sec en fer blanc, sacs en papier ou des caisses.

Cette technique est nécessaire pour les plantes qui subissent des transformations chimiques sous l'influence des ultraviolets. Les plantes riches en produits volatiles et qui s'oxydent rapidement sont conservées dans un milieu étanche. **(29 ; 30).**

Chapitre II:

Les huiles essentielles

Définition

Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances **(32).** Et « essentielle » fait référence au parfum, a l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante et au fait qu'elles soient inflammables **(33).**

Les huiles essentielles sont des substances odorantes et volatiles, non grasses, extraites d'un végétal sous forme liquide **(34).** Elles sont synthétisées par des plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires **(35).**

Seules les plantes dites « aromatiques » en produisent en quantité suffisante **(36).** Ces dernières fabriquent les huiles essentielles pour se protéger, se soigner, se réparer : elles leur servent à séduire les insectes pollinisateurs, se protéger des brûlures du soleil ou du froid, des prédateurs et des maladies, et enfin à guérir (blessures, maladies, attaques diverses…) **(37).**

Localisation

- La partie de la plante utilisée pour obtenir l'huile essentielle doit être précisée, soit pour des questions de rendement (par exemple : la fleur de lavande contient beaucoup plus d'huile essentielle que la tige soit parce que la composition chimique de la partie considérée conduira à une application spécifique très intéressante (c'est le cas d'oranger amer (Citrus aurantium, Rutaceae): l'épicarpe frais du fruit fournit l'essence de Curaçao utilisée pour confectionner des cocktails, les fleurs fournissent l'huile de Néroli (eau de fleur d'oranger amer), les feuilles et les petits rameaux fournissent l'essence de petit grain de bigaradier).
- Sur le plan quantitatif, les teneurs en huiles essentielles des plantes pouvant les contenir sont très faible, souvent inférieur à1%. Des teneurs fortes comme celle du bouton florale du giroflier (15 %) sont rares et exceptionnelles **(38 ; 39).**

A. **Fleurs** : oranger, rose, lavande, bouton floral (girofle) .
B. **Feuilles** : eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge.
C. **Fruits** : fenouil, anis, épicarpes des Citrus .
D. **Tiges** : citronnelles.
E. **Rhyzomes et racines :** gingembre, vétiver, iris.
F. **Graines :** noix de muscade, coriandre .
G. **Bois et écorces** : cannelle, santal, bois de rose **(40 ; 41).**

Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

- Les HEs sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînables à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau.
- Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé.
- Elles sont pour la plupart colorées ; rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclarée et de romarin officinal.
- Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation **(42).**
- Elles sont composées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15).
- Ce sont des mélanges complexes de constituants variés en concentration variable dans des limites définies **(43).**
- Les huiles essentielles forment donc un groupe homogène du point de vue de leurs propriétés physiques. Par contre, elles sont par leurs constitutions chimiques, le groupe le plus hétérogène qui existe **(44 ; 45).**

Composition chimique des huiles essentielles

La composition des huiles essentielles est très complexe, ce sont des mélanges fortement variables et analysables, ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par les origines biogénétiques distinctes :

A. **Le groupe des terpénoides** (les composés terpéniques).
B. **Le groupe des composés aromatiques** dérivés du phenylpropane.

Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils comme les acides, alcools, aldéhydes, esters, etc.) **(46 ; 47).**

A. Les terpènes et les Terpénoides

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, en Particulier les conifères. Les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites Secondaires .Leur classification est basée sur le nombre de répétition de l'unité de base :

Isoprène ; Hémiterpène (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20). Ils représentent le groupe le plus important **(33).**

Ce sont les plus volatiles ils ont la masse la masse moléculaire la moins élevée. On distingue les monoterpènes (myrcène, P-pinène, γ-terpinène, etc.), et les sesquiterpènes (Ecaryophyllène, α-humulène) **(35).**

- **Les monoterpènes**

Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurelles :
Les monoterpènes acycliques, monocycliques ou bicycliques. Ils constituent parfois plus de 90 % d'HE. Dans cette catégorie de composés, il existe de nombreuses molécules fonctionnalisées, à savoir, par exemple:

Alcools: acyclique (géraniol, citronellol), monocycliques (menthol), bicycliques (bornéol).

Aldéhydes : le plus souvent acycliques (géranial, néral, citronellal).

Cétones : acycliques (tagétone), monocyclique (menthone, isomenthone, carvone, pulégone), bicycliques (camphre, fenchone).

Esters : acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle), monocycliques (acetate de menthyle), bicycliques (acetate d'isobomyle).

Ethers : 1,8-cinéole eucalyptol) mais aussi les éthers cycliques tétrahydrofuraniques ou di- et tétrahydropyraniques qui pour certains jouent un role majeur dans l'arome des fruits (oxyde de linalol ou de rose).

Peroxydes : ascaridole.

Phénols : thymol, carvacrol **(33).**

- **Les sesquiterpènes**

C'est la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules. Les variations structurales dans cette série sont de même nature que dans le cas précédent, carbures, alcools et cétones étant les plus fréquents.
L'allongement de la chaine accroit le nombre de cyclisation possibles. Ainsi, plus d'une Centaine de squelettes différents ont étés décrits **(48).**

B. Les composés aromatiques

Ce sont des composés aromatiques dérivés du phénylpropane **(49).**
Les phénylpropanoïdes sont moins fréquents par rapport aux terpénoïdes. Néanmoins, certaines plantes possèdent ces composés avec des proportions significatives.
Les phénylpropanoïdes dérivent majoritairement de la phénylalanine.

Ils sont constitués d'une chaine carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones **(50).** Ces composes aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des HE. On peut citer en exemple l'eugenol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle **(51).**

- **Composes d'origine diverse**

En générale, ils sont de faibles poids moléculaire, entrainables lors de l'hydro-distillation, sont des hydrocarbures aliphatiques à chaine linéaire ou ramifiée porteurs de différentes fonctions par exemple : l'heptane et la paraffine dans l'essence de camomille

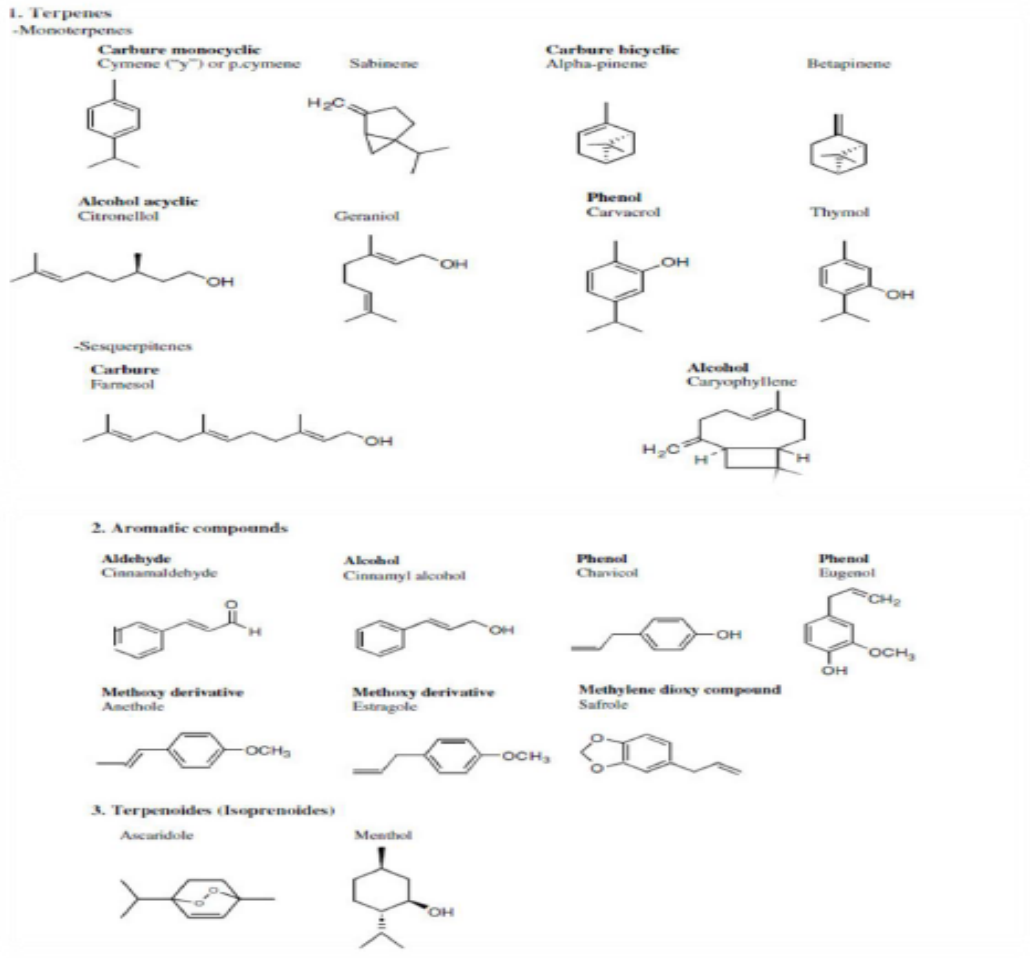


Figure 05: Classes des constituants chimiques des huiles essentielles **(52).**

Biogenèse des composés des huiles essentielles

La biosynthèse des constituants des huiles essentielles emprunte deux voix utilisant comme intermédiaire soit l'acide mevalonique, soit l'acide shikimique respectivement pour les terpénoïdes et les phénylpropanoides **(53).**

- **Voie des terpénoïdes**

La première est la voie du mévalonate. Elle prend son origine au niveau de l'acetylcoenzymeA (produit de la glycolyse). Elle débute par la condensation de trois unites d'acetylCoA, passe par un composé en C6 (le mévalonate) et conduit au PPI3.

Figure 06 : Condensation de type Claisen entre deux molecules d'acetylCoA pour conduire a l'acetoacetylCoA

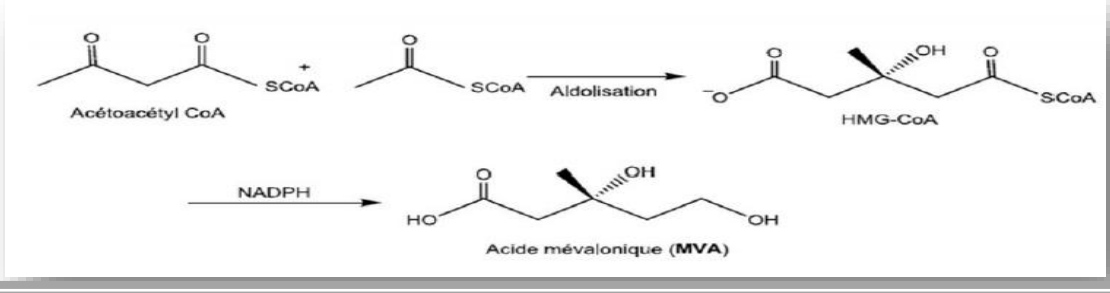


Figure 07 : Réaction d'aldolisation entre une 3ème molécule d'acetylCoA et l'acetoacetylCoA. Apres hydrolyse et réduction par le NADPH, il y a formation de l'acidemévalonique**.**

La déshydratation et la décarboxylation de l'acide mevalonique(MVA) par une élimination concertée après sa pyrophosphorylation par l'ATP permettent d'aboutir aux deux intermédiaires en C5, bio-précurseur des terpènes : le PPI3 et le PPI2.

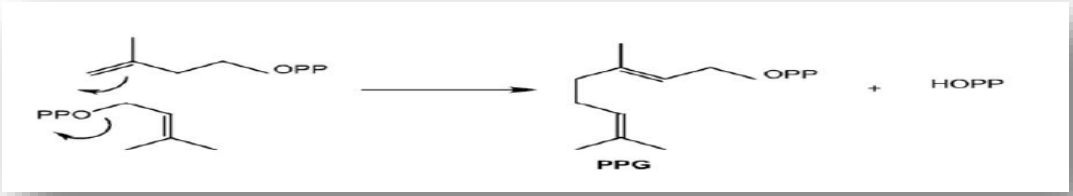


Figure 08 : Deux intermédiaires PPI3 et PPI2 réagissent entre eux pour générer le pyrophosphate de géranyle (PPG) point de départ de tous les monoterpènoides

La seconde voix

La voix du méthylérythritol phosphate (MEP) nommée aussi la voie nonmévalonique.

Elle commence par la condensation d'une unité pyruvate (C3) avec une unité de glycéraldéhyde 3-phosphate (C3) et conduit au méthylérythritol phosphate, un composé Intermédiaire en C5.Plusieurs étapes enzymatiques conduisent ensuite à la synthèse de PPI3 (**figure 9).**

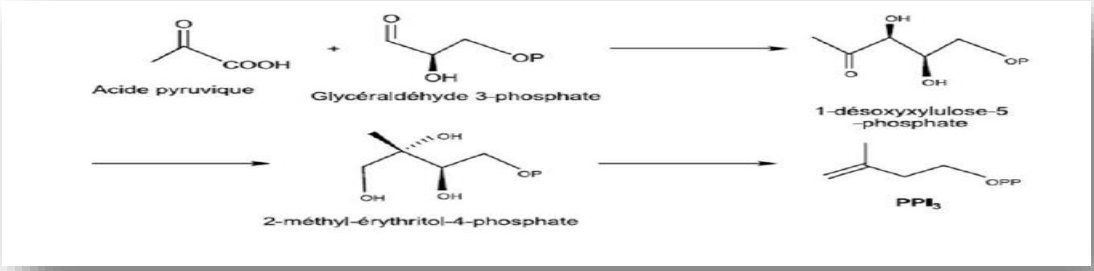


Figure 09 : Représente la voie non mévalonique ou la voie du méthylérythritol phosphate (MEP)

- **La voie des phénylpropanoides (composés aromatiques)**

La biosynthèse des dérives du phenylpropane se fait par l'intermédiaire de l'acide shikimique qui représente le principal mode d'accumulation des phénols dans les plantes.

Cette voie fait intervenir une série de réactions et représente le chemin biosynthétique des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane…).

L'acide est obtenu par condensation de l'acide pyruvique active par phosphorylation sur un sucre phosphoryle. L'addition d'une deuxième molécule d'acide pyruvique active fournit l'acide prephenique qui par déshydratation et décarboxylation donne l'acide phénylpyruvique

Cet acide aromatique se transforme en phénylalanine, acide aminé aromatique, qui est à l'origine du métabolisme des composés aromatiques **(53).**

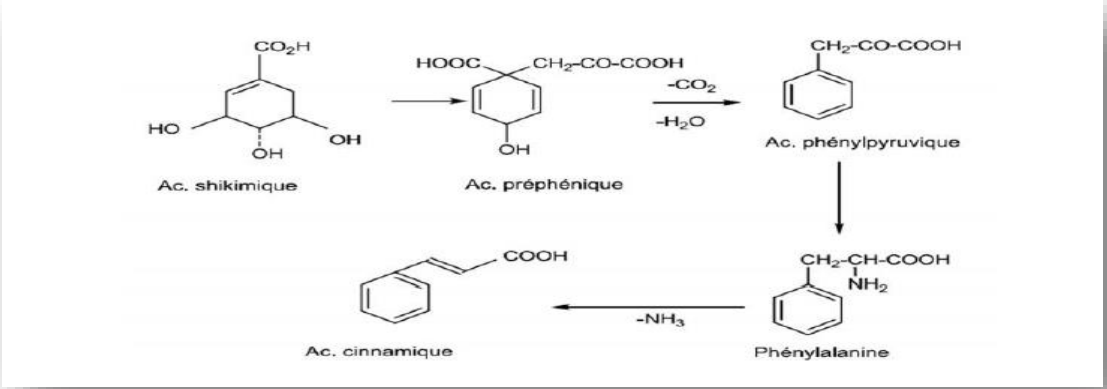


Figure10 : Exemple de synthèse des dérivés du phénylpropane

Les facteurs influençant la composition chimique

Divers travaux ont démontré que le contenu de l'huile essentielle peut changer en fonction des différences d'origine botanique ; L'organe producteur ; Cycle végétatif ; Existence de chimiotypes ; Température, Rayonnement solaires ; Mode d'obtention et les facteur genetique (hybridation ; mutation).

Ces facteurs influent sur la croissance de la plante **(54).** La physiologie et la morphologie des plantes, l'écologie des gènes et les tendances des organes qui dans le sens chimique, conduisent à la différenciation entre les espèces **(55).**

Méthodes d'extraction des HE

L'obtention des huiles essentielles fait appel à diverses techniques d'extraction. Certain sont plus anciennes et simples d'opération et d'autres plus récentes et performantes mais plus complexe comme l'extraction au CO_2 supercritique et l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes **(56).** Ces dernières visent à optimiser la qualité de l'huile, tout en maintenant un rendement intéressant. Les techniques d'extraction les plus employée sont : la distillation et l'extraction par les solvants organiques.

Le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (grains, feuilles …..) de la nature des composés (par exemple, les huiles essentielles, huiles lourdes …), du rendement en huile et de la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

I. Distillation

La distillation à la vapeur d'eau est. simple dans son principe et utilise un équipement peu couteux. Elle se présente sous trois (03) variantes : l'hydro-distillation ; l'entrainement à la vapeur et hydro-diffusion **(58).**

- **Hydro-distillation ou clevenger**

Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide dit réfrigérant et l'huile essentielle se sépare par différence de densité **(39).**

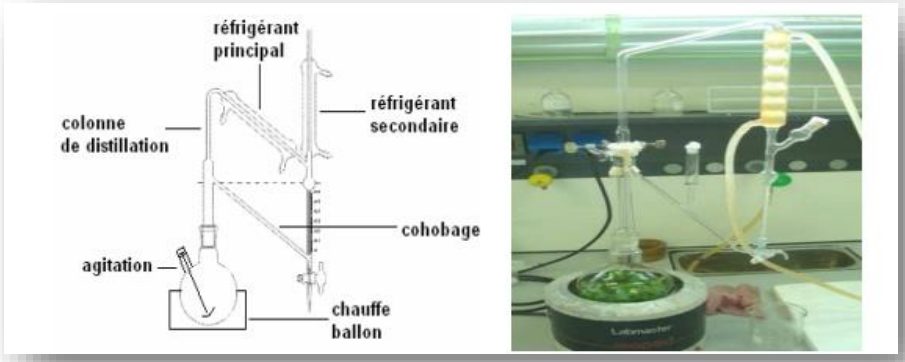


Figure 11 : Représente montage d'hydro-distillation

- **Hydro diffusion**

Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange < vapeur d'eau-HE > dispersé dans la matière végétale.

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. De plus, l'hydro-diffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur **(61).**

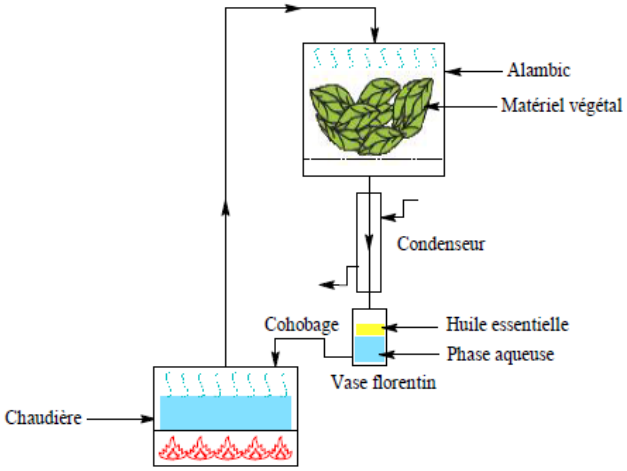


Figure 12 : Schéma du principe de la technique d'extraction par hydro-diffusion.

- **Entrainement à la vapeur d'eau**

Dans ce procède, le végétal n'est pas en contact avec l'eau : la vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées **(59).**

La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse le matériel, les cellules se distendent et les particules d'huile se libèrent, la vapeur circule et chasse la plupart de ses composés parfumés volatils. Puis traverse un tube froid où elle sera condensée. Après 3 heures, le distillat est récupéré dans une fiole réceptrice puis séparé en une phase aqueuse et phase organique **(62).**

Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques **(63).**

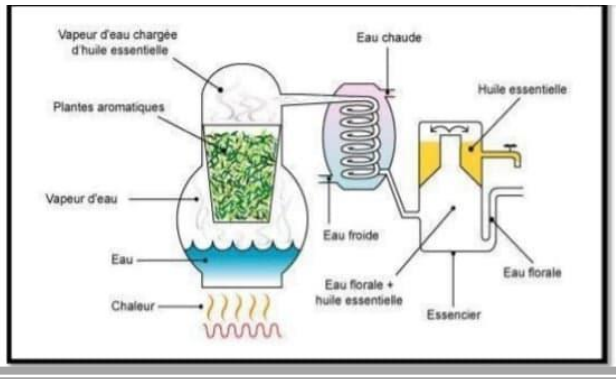


Figure13: Schéma du principe de la technique d'extraction par entrainement à la vapeur **(64).**

II. Extraction par solvants volatils

Cette technique est utilisée avec les plantes dont l'extraction d'huiles essentielles grâce à l'hydro-distillation est inefficace: c'est le cas du jasmin, de certaines roses, du narcisse, du néroli du mimosa**. (65)**Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui sera ensuite éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne laconcrète: mélange odorant de consistance pâteuse. L'extraction de la concrète avec l'alcool conduit à l'absolue **(66).**

Parmi les solvants utilisés, sont le méthanol, l'éthanol et l'éther de pétrole l'appareillage le plus utilisé est celui de Soxhlet **(67).**

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient : **(68).**

- Des hydrolysats (eau commesolvant)
- Des alcoolats (éthanol dilué).
- Des teintures (éthanol/eau).
- Des résinoïdes (extraits éthanoliques concentrés).
- Des concrètes (extraits à froid et à chaud au moyen de solvants divers).

L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la règlementation liée à la protection de l'environnement.

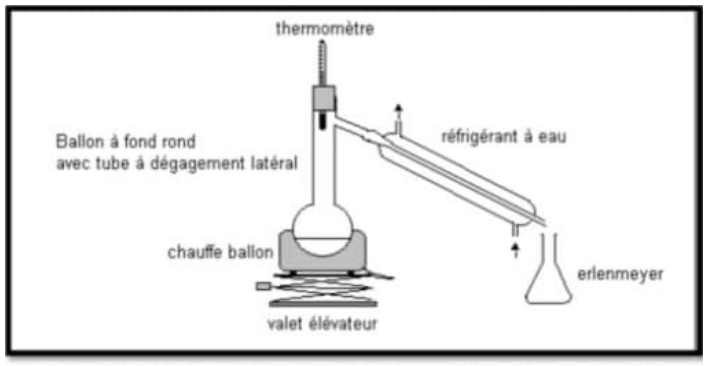


Figure 14 : Schéma du principe de la technique d'extraction par solvant organique **(69).**

III. Extraction par enfleurage

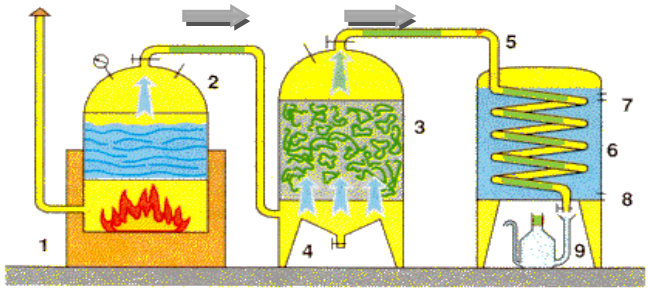
L'enfleurage est l'un des plus anciens procédés. Il est basé sur l'affinité des parfums pour les graisses. Dans ce système d'extraction, on distingue deux méthodes selon la résistance de la plante à la chaleur : l'enfleurage à froid et l'enfleurage à chaud **(70 ; 71).**

Enfleurage à froid : permet de traiter les fleurs les plus délicates comme jasmin ou la tubéreuse). Pratiquement, on dépose manuellement ou délicatement les pétales de fleurs une à une sur des plaques de verre enduites d'une mince couche de graisse inodore. Puis, on superpose ces plaques sur des châssis de bois. Les substances volatiles diffusent et sont absorbés par la couche de graisse. Au bout de quelque jour, la graisse est saturée en essence végétale. on renouvelle périodiquement les fleurs 10à 15 fois jusqu'à saturation du corps gras (2Kg de fleurs pour 1 Kg de graisses). Une fois la graisse parfumée recueillie, on la fond au bain-marie. On la décante et on la filtre. Apres refroidissement, on obtient une pommade florale qui restitue fidèlement l'odeur de la fleur et qui est ensuite épuisée à l'alcool.

Enfleurage à chaud : consiste à faire infuser les fleurs les moins fragiles (telles que la rose de mai, la cassie, la violette ou la fleur d'oranger) dans des graisses ou des huiles inodores probablement chauffée au bain-marie.

Ce procédé est pratiquement en voie de disparition en raison de son cout élevé et de la nécessité d'une main d'œuvre importante

un enfleurage à chaud est réalisé vers 60-70°C, par leur infusion dans des graisses fondues ou des huiles. Cette méthode est plus rapide que celle à température ambiante **(72).**



1: Foyer - 2: Chaudière - 3: Vase à fleurs - 4: Vidange de condensation - 5:Col de cygne - 6: Réfrigérant avec serpentin - 7: Sortie d'eau chaude - 8: Arrivée d'eau froide - 9: Essencier servant à la décantation de l'essence et de l'hydrolat

Figure 15 : Représente montage d'extraction par enfleurage

IV. Extraction à froid

Ce mode d'obtention particulier est réalisé uniquement pour les fruits de la famille botanique des Rutaceae (citron, orange, bergamote, mandarine, etc.) qui sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique qui est l'expression à froid **(67).**

C'est une méthode simple qui consiste à briser mécaniquement par abrasion les poches oléifères localisées au niveau de l'écorce ou du péricarpe du fruit pour en recueillir le contenu **(61).**

L'huile essentielle est séparée du jus de fruit par un procédé mécanique de décantation à froid ou centrifugation .Cette méthode rapide et efficace donne une essence de bonne qualité **(70).**

Figure16 : Technique d'extraction a froid **(62)**.

V. Extraction a CO2 supercritique

Les fluides supercritiques peuvent être définis comme toute substance se trouvant dans des conditions de température et de pression supérieures à sa température critique et sa pression critique. Ils possèdent certaines propriétés physico-chimiques typiques des gaz, et d'autres proches de celles des liquides. Cette technique est fondée sur la solubilité des constituants dans

le dioxyde de carbone à l'Etat supercritique. Grâce à cette propriété, Le CO2 permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux.

Il est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal. Après le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur ou il sera séparé en extrait et en solvant **(73).**

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. Cette technique et utilisable pour les essences difficilement distillables.

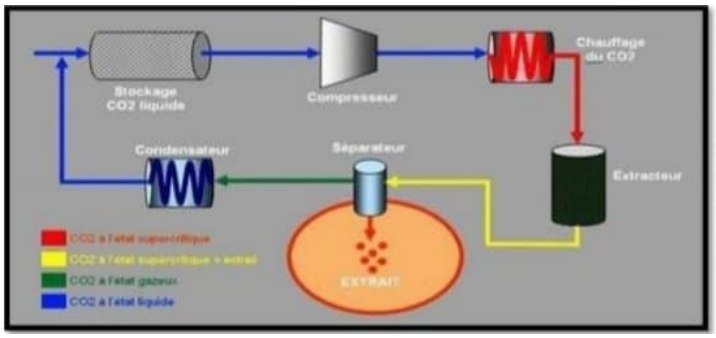


Figure 17 : Schéma du principe de la technique d'extraction par CO2 supercritique **(74).**

VI. Extraction par micro-ondes

Cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Les parties du végétal les plus riches en eau, comme les vacuoles, absorbent les ondes puis les convertissent en chaleur, engendrant une augmentation rapide et soudaine de la température au sein de ces structures. Ces dernières éclatent sous la pression régnant dans l'extracteur, libérant ainsi les molécules olfactives. Puis les vapeurs d'eau entrainent l'HE. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation de façon continue du distillat, compose d'eau et d'huile essentielle, et le retour de l'excès d'eau a l'intérieur du ballon afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal Pour les plantes aromatiques, après seulement 30 minutes d'extraction, les rendements en huiles essentielles obtenus sont identiques à ceux obtenus après 6 heures d'hydro distillation **(75).**

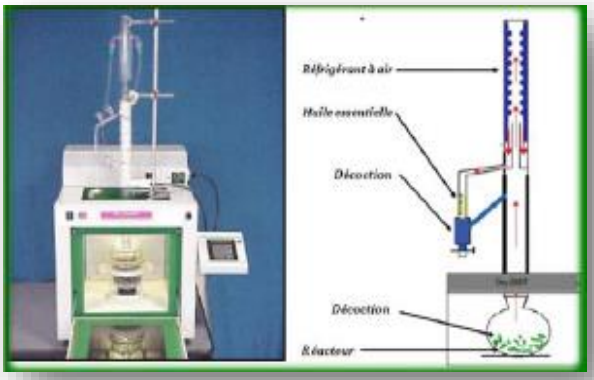


Figure18 : Dispositifs d'extraction assistée par micro-ondes

Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont plusieurs activités biologiques à savoir l'activité antibactérienne, antifongique, antivirale, pesticide et même une activité anti- cancéreuse.

- **Activités antioxydants**

Les substances polyphénoliques des huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés biologiques, mais la propriété la mieux décrite dans tous les groupes de composés phénoliques est leur capacité d'agir comme antioxydant. L'activité antioxydant des phénols dépend de la disposition des groupes fonctionnels autour de la structure nucléaire, la configuration, la substitution et le nombre total des groupes hydroxyles qui influencent considérablement les différents effets antioxydants des radicaux et la chélation des métaux **(76).**

Les huiles essentielles, ont été largement évaluées concernant leurs activités antioxydants puisqu'ils ont été utilisés dans les aliments industriels comme des antioxydants naturels **(77).**

- **Activités antibactériennes**

L'action des huiles essentielles s'exerce sur un large spectre de bactéries, incluant les bactéries à Gram positives et les bactéries à Gram négatives. La structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positives les rend toutefois plus sensibles à l'action des huiles essentielles **(78).**La structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives les rend moins sensibles à l'action des huiles essentielles. La présence d'une membrane plasmique hydrophile externe chez les Gram négatives empêche la pénétration intracellulaire des molécules hydrophobes composant la majorité des huiles essentielles. Cette caractéristique confère aux bactéries négatives une résistance à l'huile et même aux antibiotiques **(79).**

➢ **Activités antifongiques**

Les groupes moléculaires (phénols) se révèlent également actifs sur les champignons. Elles sont actives sur les levures, les dermatophytes et les filamenteux. On peut citer quelques exemples de champignons comme Trichophyton, Candida, Micosporum ou Epidermophyton. Le traitement sera de plus longue durée que pour un usage antibactérien**(44).**

Elles agissent à différents niveaux :

- Sur la paroi ;
- Sur la membrane ;
- Sur la synthèse des acides nucléiques ;
- Sur la synthèse des stérols **(80).**

➢ **Activités anti-inflammatoires**

Les huiles essentielles possédant des aldéhydes ont des propriétés actives contre l'inflammation par voie interne comme l'HE du Gingembre **(81).**

➢ **Activités antivirales**

Les huiles essentielles détruisent les agents pathogènes responsables de l'infection (microbes, champignons, virus, toxines infectieuses). Elles sont donc utiliser dans le traitement des affections virales, telles que la grippe, l'herpès, le zona, le sida et la poliomyélite **(82).** Plusieurs huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales. Nous pouvons citer l'huile essentielle de Ravintsara, l'huile essentielle de Bois de Hô, et l'huile essentielle de Cannelle de Ceylan **(83;84).**

➢ **Activité antiseptique**

Les molécules aromatiques sont donc capables de détruire les germes infectieux ceux qui transmettre facilement dans les bureaux, les locaux publics, les écoles, les crèches et même les hôpitaux. Grâce à leur pouvoir antiseptique **(85).** Et de s'opposer a leurs prolifération tant dans les organismes vivants que dans l'environnement.

les huiles essentielles peuvent permettre d'assainir l'air ambiant ou les systèmes de ventilation **(85).**

Les alcools allies aux cineole, comme c'est le cas dans l'HE d*'Eucalyptus radiata,* sont intéressants en période hivernale pour l'assainissement de l'air des habitations **(86).**

➢ **Activité antiparasitaire**

- Les molécules aromatiques possédant des phénols et alcools terpéniques ont une action puissante contre les parasites **(81).**

- Les cétones ont également une activité antiparasitaire mais leur utilisation est plus limitée en raison de leur neurotoxicité **(87).**
- Certains oxydes, comme l'ascaridole, sont également très spécifiques de la lutte antiparasitaire, et constituent de bons anthelminthiques **(86).**
- Le thym à linalol, la sarriette des montagnes ont d'excellentes huiles essentielles antiparasitaires **(81).**

Domaines d'utilisation des huiles essentielles

- **En pharmacie**

On distingue nombreux produits tels que les pommades, les crèmes et les Gels à base d'huiles essentielles permettraient de faciliter l'administration des médicaments par voie transdermique et grâce à la propriété de ces huiles à pénétrer aisément dans la Peau.

Généralement ces produits sont destinés à soulager les entorses, les courbatures, les Allergies articulaires ou musculaires **(88).**

- **En cosmétologie**

Les huiles essentielles sont utilisées depuis longtemps en cosmétologie. En raison de leurs propriétés diverses, elles prennent soin de la peau et de ses désordres (acné, rides..), les cheveux (pellicules, cheveux cassants, ternes, sec..), la silhouette (vergetures, cellulite..)

Ils ont utilisé dans la formulation de parfums de produits d'entretien personnels ou ménagers domestiques ou industriels **(89).** Partout dans le monde les huiles essentielles sont utilisées pour leur parfum. Les HEs sont employés en tant qu'agent conservateurs Grâce à leurs propriétés antimicrobiennes qui permettent d''augmenter la durée de Conservation du produit et grâce à leurs caractéristiques odorantes en raison de leur forte Volatilité permet de ne laisse pas de trace grasse.

- **En industries agroalimentaires**

En vertu de leurs propriétés antiseptiques et aromatisants, les HE sont employées quotidiennement dans les préparations culinaires (ail, thym, laurier..)**.**

Elles sont également très prisées en liquoristeries (boissons anisés, kummel..) et en confiserie (bonbons, chocolat..).Leur pouvoir antioxydant leur permet de conserver les aliments en évitant les moisissures, conservation du *smen* par exemple par le thym et le romarin **(53).**

- **En agriculture**

L'utilisation des huiles essentielles dans le domaine de l'agriculture est encore débutante mais est appelée à se développer. Les huiles essentielles sont actuellement testées sur différentes cibles : les insectes, les champignons, les bactéries, les adventices et également pour la

conservation des semences. De nouveaux produits à base d'huiles essentielles tardent à arriver sur le marché en raison d'une règlementation complexe. En effet, leur autorisation est soumise à la règlementation des produits phytopharmaceutiques, nécessitant d'apporter la preuve de l'efficacité et de la non dangerosité du produit. L'utilisation des huiles essentielles en agriculture biologique nécessite également leur inscription sur une liste dite « positive » de produits autorisés **(90).**

Toxicité des huiles essentielles

Les HE sont des molécules actives. Elles peuvent avoir de graves effets secondaires. Il est important de respecter la posologie et la durée de la prise. Parmi ces effets, citons : des allergisants ou hyper sensibilisants, photosensibilisants dus aux furocoumarines, neurotoxiques dus aux cétones, néphrotoxiques dus aux terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de Térébenthine et des rameaux de Genévrier, hépatotoxiques dus aux phénols pris pendant des laps de temps trop importants ou à doses massives L'eugénol, qui est l'un des constituants du Thym, est hépatotoxique. Chez l'enfant, 10 ml eugénol peut conduire à une insuffisance rénale. Il a été démontré que le linalol, l'un des constituants d'une autre espèce de thym, est cytotoxique pour les cellules de la peau humaine **(91).**

Conservation des huiles essentielles

- L'emploi de flaconnage en verre colore et fonce (brun ou ambre), en aluminium ou en acier inoxydable, de faible volume, évite la détérioration de l'HE par l'oxygène et la lumière **(38 ; 92).**
- Le flacon doit être pourvu d'un bouchon visse et bien scelle pour éviter l'évaporation.
- L'emploi de petites billes en verre a la surface de l'HE réduit l'action oxydante de l'air
- Le stockage doit se faire dans un endroit sec (a l'abri de toute trace d'humidité), frais (loin des sources de chaleur), dépourvu de la lumière, même artificielle et a l'abri du froid.
- La durée de conservation d'une HE, si on a respecte les bonnes conditions de stockage, est environ 3 ans.
- Les essences d'agrumes font exception, ils ne peuvent se conserver que pendant6 mois **(93).**

- **Etiquetage**

Les informations qui doivent figurer sur l'étiquète sont les suivantes :

- Nom scientifique et vernaculaire de la plante.
- La partie de la plante utilisée.
- L'origine de la plante ou lieu de production.
- Mode d'obtention de l'HE.
- La variété et le chemotype s'il existe.
- Numéro de lot, date de production et date de péremption.
- Nom adresse et numéro de téléphone du fournisseur **(94).**

Chapitre III:
Généralité sur Thymus vulgaris et Thymus serpyllum

Généralité

Le genre Thymus est un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des labiées, avec pour centre de diversité la partie occidentale du bassin méditerranéen **(95).** Comme beaucoup de labiées elles sont connues pour leurs huiles essentielles aromatiques. L'espèce la plus connue estsans conteste *Thymus vulgaris L*, localement connu zaatar. En français et anglais par exemple, on emploie fréquemment le nom du genre (thym et thyme respectivement) pour désigner l'espèce *Thymus vulgaris* **(96).** Les autres espèces sont des plantes que l'on regroupe sous le nom global de « serpolet ». Ce nom dérive, via le provençale, du latin serpyllum qui désignait les tymus rampants (également serpillum et serpllum). Il vient du grec herpillos, désignant les plantes **(93).**

Les thymus sont des plantes herbacées ou de petits buissons dont la base est ligneuse. Ils poussent bien en pot. Le genre thymus, appartenant à la famille des menthes, fédère environ 350 espèces, largement originaire du bassin méditerranéen puisque 70 espèces y sont communes.

Généralité sur la famille des lamiacées

La famille des Lamiacées, anciennement appelée Labiées en raison de la corolle en deux lèvres de ses petites fleurs **(94)**. Est l'une des familles les plus larges dans le règne végétal. Elle comprend approximativement 240 genres et 7200 espèces qui sont plus ou moins cosmopolites mais particulièrement répandus depuis le bassin méditerranéen jusqu'en Asie centrale **(95)** .Elle est divisée en sept sous-familles : *Ajugoideae, Lamioideae, Nepetoideae, Prostantheroidea, Scutellarioideae, Symphorematoideae et Viticoideae* **(96).**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'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti- inflammatoire et antioxydant

Habitat et Culture

Le thym est très résistant, il pousse bien sur des collines arides et rocailleuses des régions Méditerranéenne.

Il nécessite des endroits constamment ensoleillés et quelque peu riches en matières organiques et en éléments minéraux fertilisa ; les sols légers, perméables, secs ou bien drainés, légèrement alcalins **(97;91; 98).** C'est d'ailleurs sur ce genre de sols que se développe mieux son arome.

Dans les endroits de forte gelée, une protection est recommandée durant l'hiver. La reproduction se fait par semis ou bouturage, réalisée mis avril ou plus rarement en aout.

Principe actif de thym

Les principaux composés bioactifs reconnu dans le Thym sont :

- **Les acides phénoliques** : acides caféique(**99).** acide rosmarinique **(69).**
- **Les flavonoïdes** : hesperédine, eriotrécine, narirutine **(69).** lutéoline **(100).**
- **Les polyphénols** : tanin (**99 ; 101).**

Huile essentielle

Le thymol et le carvacrol sont les principaux composés phénoliques du genre Thymus. Ainsi que le para-cymene, 1,8 cineol et le linalol. Les huiles essentielles contiennent aussi d'autres monoterpènes et sesquiterpènes tel que :

- terpinène
- E-caryophyllène
- Oxyde de caryophyllène
- pinène
- Camphre
- Bornéol
- Terpinolène

Les espèces du thym peuvent être regroupées selon des chémotypes identifiés par leur richesse en certains composants par exemple

Chémotype1 : huile essentielle riche en carvacrol ;

Chémotype 2 : huile essentielle riche en monoterpènes aromatiques (principalement thymol) et plus pauvre en carvacrol ;

Chémotype 3 : huiles essentielle riche en 1,8 cinéol **(102).**

I. Thymus vulgaris

Description botanique

Thymus vulgaris L. (**Figure 19)** est un sous-arbrisseau touffu, vivace et aromatique pouvant atteindre de 20 à 30 cm de hauteur **(45).** Ses tiges ligneuses à la base, herbacées supérieurement sont presque cylindriques. Ses feuilles sont très petites, ovales, à bord roulé en dessous, à nervures latérales distinctes, aux pétioles extrêmement courts et blanchâtres à leur face inférieure.

Ses fleurs presque roses ou blanches, font de 4 à 6 mm de longueur, et sont pédicellées et réunies ordinairement au nombre de trois à l'aisselle des feuilles supérieures **(103).** et qui sont recouvertes de poils tecteurs et sécréteurs (appelés trichomes).

Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de mono-terpènes

Les calices et les jeunes tiges sont aussi couverts de ces structures qui libèrent l'essence par simple contact, bien qu'en plus faible densité sur les tiges. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose **(104 ; 105).**

Figure 19 : Représente *Thymus Vulgaris*

Classification

Tableau 01 : Représente classification de *Thymus vulgaris*

Règne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta
Sous embranchement	Magnoliophytina
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	*Thymus*
Espèce	*Thymus vulgaris L*

Propriétés thérapeutiques et usages

Propriétés thérapeutiques

Antimicrobienne : antibactérienne, antifongique et antivirale; Antioxydant ; Antispasmodique et antitussive ; Tonique, utérotonique, neurotonique et cardiotonique ; Antalgique ; Antidiabétique ; Immunostimulante par augmentation des IgA **(86 ; 104).**

Usage traditionnel et courant

En cuisine

- Le thym est une plante aromatique odorante, très utilisée en cuisine dans la préparation de nombreux plats **(33).** Il peut avoir un arrière-goût citronné ou un parfum de verveine. Il donne une touche méditerranéenne à tous les plats, que ce soit la tomate, la grillade, le fromage de chèvre, la terrine, les pâtes et les plats mijotés. Il entre dans le classique bouquet garni. Dans une marinade, il parfume aussi bien les légumes que la volaille et la charcuterie, le poisson que le gibier **(106).**

En thérapeutique

- Traitement symptomatique de la toux.
- Traitement symptomatique des troubles digestifs : ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations, flatulences **(33).**
- La drogue est employé pour son activité spasmolytique comme stomachique et carminatif, mais aussi comme diurétique, désinfectant urinaire et vermifuge **(107).**

En usage local, elle est utilisée :

- En cas de nez bouché et de rhume
- Pour le traitement de petites plaies après lavage abondant.
- En bain de bouche pour l'hygiène buccale **(33).**
- En cas d'amygdalite **(108).**
- Pour le traitement de l'acné et des verrues **(108).**
- La Commission E précise que la feuille et les fleurs sont utilisées dans le traitement symptomatique des bronchites et de la coqueluche, ainsi qu'en cas d'inflammation des voies respiratoires supérieures.

Usage de l'huile essentielle

- L'huile essentielle est largement utilisée en aromathérapie comme antiseptique.
- Elle entre dans la composition de diverses spécialités (pommades antiseptiques et cicatrisantes, sirops pour le traitement des affections des voies respiratoires, préparations pour l'antisepsie buccale).

- Le thym est utilisé sous forme de bains aromatiques ainsi qu'en traitement complémentaire en cas d'affections aigues ou chroniques des voies respiratoires ou de prurit lié à une dermatose.
- On l'utilise aussi en frictions, diluée à 10 %, pour traiter les douleurs rhumatismales et les névralgies **(109).**

II. Thymus serpyllum

Description morphologique

- *Thymus serpyllum* **(Figure 20)** est un sous-arbrisseau de 5 à 20 cm à base ligneuse souvent gazonnant, très aromatique. Tige couchée, rampante portant des pousses dressées ligneuses, petites feuilles opposées, presque dépourvue de pétioles, arrondies ou linéaires.
- Les fleurs, roses ou blanches, sont petites et irrégulières (zygomorphes), à calice poilu polymorphe **(110).**
- De Juin à Septembre, son feuillage aromatique vert à reflets pourprés sous le soleil disparaît littéralement sous une nuée de petites fleurs bleues groupées en capitules terminaux. Après la floraison (Juin à Octobre) viennent les fruits formés de quatre petits akènes **(111).**

Figure 20 : Représente *Thymus serpyllum*

Classification

Tableau 02 : Représente classification de *Thymus serpyllum*

Règne	Plantae (végétal)
Sous règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	**Magnoliopsida**
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	*Thymus*
Espèce	*Thymus serpyllum*

Utilisation thérapeutique

- *Thymus serpyllum* (serpolet) est reconnu pour son usage dans divers remèdes traditionnels : antiseptique, antispasmodique, carminatif, digestif, diurétique, expectorant, vermifuge.
- **Usages internes** contre la bronchite et la congestion pour calmer la toux et comme désinfectant de l'appareil digestif;
- **Usages externes** pour baigner les plaies guérissant mal et en gargarismes, contre lesinflammations des gencives.
- *Thymus serpyllum* traite les affections buccodentaires : algie dentaire, aphtes, hémorragie, gingivite, herpès labial, mauvaise haleine, stomatite et les maladies du système digestif et du système respiratoire **(110).**

Chapitre IV
Généralité sur les bactéries pathogènes

Généralités sur les bactéries

Définition

- Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires et procaryotes présents dans tous les milieux. La plupart d'entre elles possèdent une paroi cellulaire glucidique.
- Elles ont une taille moyenne de 0,5 à 2 µm de large et 2 à 6 µm de long, parfois beaucoup plus **(112).**
- Elles présentent de nombreuses formes : coques (diplocoques, amas, chainette) bacilles (droits, incurvés spiralés). Ces formes sont dues à la structure de la paroi peptidoglycane et au mode de septation propre à chaque espèce bactérienne.
- Les bactéries peuvent être groupées en deux catégories selon la méthode de coloration de Gram, méthode qui tient son nom du bactériologiste danois Hans Christian Gram.
- Le protocole consiste à utiliser une coloration au violet de gentiane puis une décoloration à l'alcool-acétone. En raison de leur épaisse paroi de peptidoglycane, les bactéries Gram positif garde la coloration violette. Les bactéries Gram négatif, avec une paroi plus fine et plus perméable à la décoloration, perdent la couleur violette elles seront révélées avec de la fuscine et apparaitront teintées en rose **(Figure21).**
- L'invention du microscope électronique et le développement des techniques d'analyses biochimiques ont permis de bien élucider les différences structurales et les compositions chimiques existantes entre la paroi Gram positif et la paroi Gram négatif

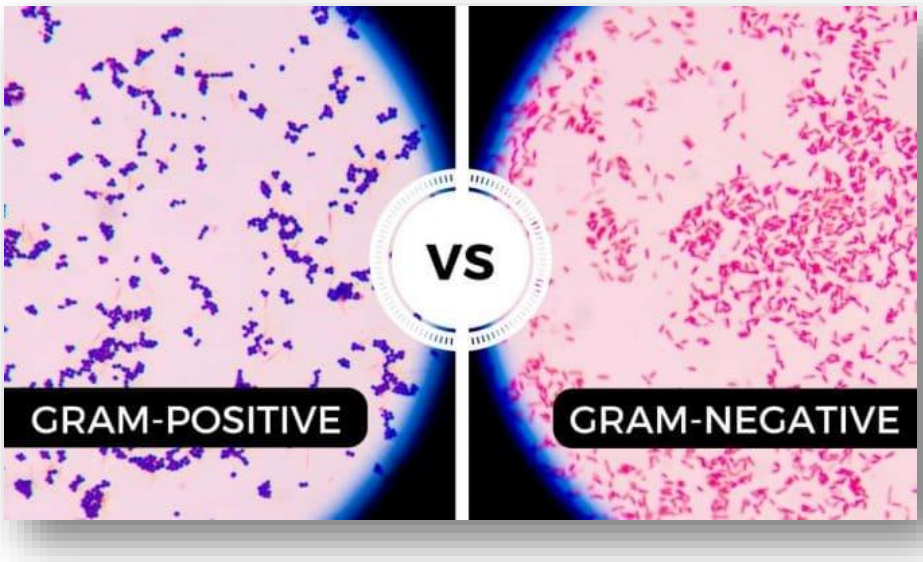


Figure 21 : Représente la coloration de gram (positive et négative)

Structure des bactéries gram positifs et négatifs

Gram positif

Les bactéries Gram positif possèdent une paroi bactérienne qui se compose d'une couche peptidoglycane d'une épaisseur approximative de 20 à 80 nm.

Elles représentent 90% des constituants de la paroi bactérienne.

Cette couche est constituée d'acides teichoïques (polymères contenant du ribitol, du glycérol phosphate et des sucres) et d'acides lipoteichoïques qui s'enfoncent jusqu'à la membrane cytoplasmique par leur partie lipidique.

Gram négatif

La couche peptidoglycane des bactéries Gram négatif est plus fine et ne dépasse pas 20 nm, elle est recouverte par une membrane externe dans laquelle on trouve des protéines et des lipopolysaccharides, qualifiés d'endotoxines pour leurs propriétés inflammatoires.

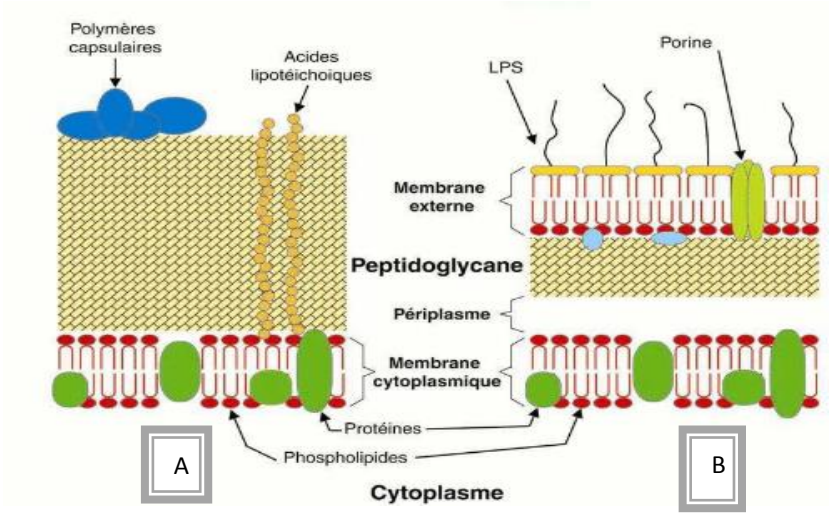


Figure 22 : Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram-positives (A) et Gram négatives (B)

Bactéries à gram positif

Staphylococcus aureus

Caractère bactériologique

- *Staphylococcus aureus* est une cocci bactérie Gram positif, aéro-anaérobies facultatifs appartenant à la famille des *Staphylococcaceae.* **(113 ; 114).**
- Elle a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 µm, immobile, asporulé; et habituellement disposé en grappes.

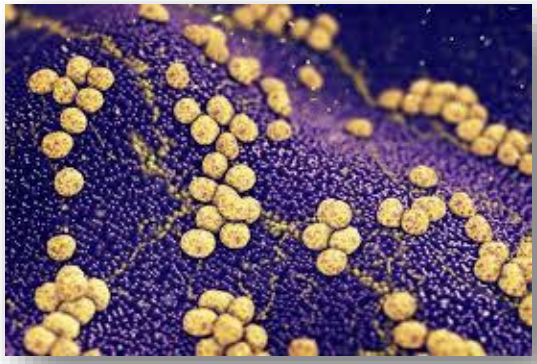


Figure 23 : Observation microscopique de *Staphylococcus aureus.***113 ; 114).**

Habitat

Staphylococcus aureus fait partie de la flore humaine, elle est présente à plusieurs endroits chez les humains : nez, aine, aisselle, région périnéale (hommes), muqueuse, bouche, glandes mammaires, cheveux, tractus intestinal, appareil génito-urinaire et voies respiratoires supérieures **(114 ; 115 ; 116).**

Classification

Tableau 03 : Représente la classification classique de *Staphylococcus aureus*

Règne	Bacteria
Division	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	*Staphylococcus*
Espèce	*aureus*

Pouvoir pathogène

Staphylococcus aureus est un pathogène opportuniste qui peut causer diverses maladies chez les humains, allant des affections qui évoluent spontanément vers la guérison à des pathologies mortelles **(114).**

Cette bactérie est une des principales causes de toxi-infections alimentaires, résultant de la consommation d'aliments contaminés par des entérotoxines**(115).**

L'intoxication alimentaire par les staphylocoques se caractérise par une apparition brutale de nausées, vomissements, douleurs abdominales, crampes et de diarrhée **(114 ; 115).** Les symptômes disparaissent habituellement après 24 heures.

Bactérie à gram négatifs

Pseudomonas aeruginosa

Caractère bactériologique

- La *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie gram-négative du genre *Pseudomonas.*
- Les souches de cette espèce sont constituées de bacilles de 0,5 à 0,8 µm de diamètre sur 1,5 à 3,0 µm de longueur, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou en courtes chaînes **(figure24. A),** très mobiles grâce à une flagelle polaire : ciliature monotriche **(figure24.B)**, dépourvue de spores et de capsule

- Elles apparaissent la plupart du temps isolées ou en diplobacilles **(117).**

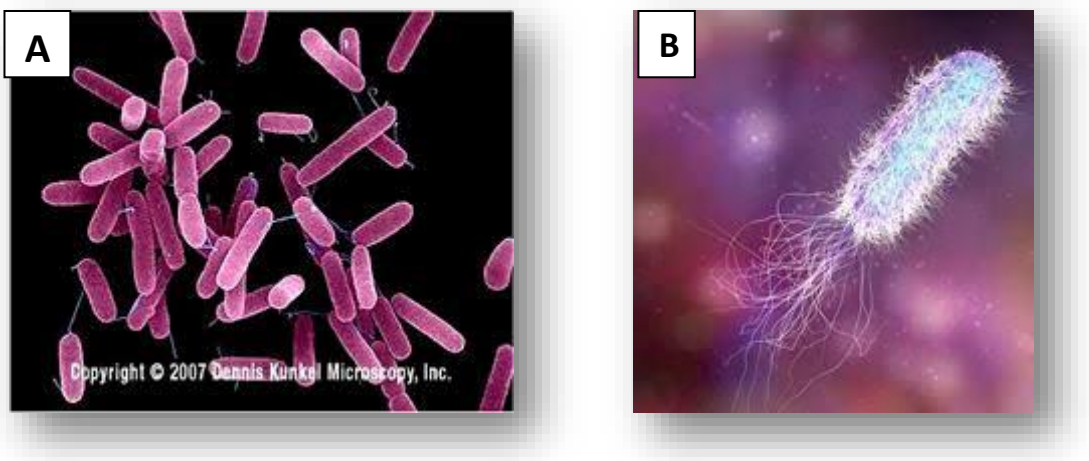


Figure 24 : Observation microscopique *de Pseudomonas aeruginosa*

Habitat

Germe ubiquitaire, vivant dans les sols et en milieu humide (éviers, robinets et bouchons), fréquent en milieu hospitalier, entraînant l'apparition de véritables souches d'hôpital.

Il peut survivre dans de l'eau distillée ou salée, voire se développer dans certaines solutions antiseptiques ou antibiotiques.

L'exploration instrumentale lors d'examens médicaux (cathéter veineux, sondes, endoscopies) favorise la pénétration de ce germe dans l'organisme **(118 ; 119).**

Classification

Tableau 04 : Représente la classification classique du *Pseudomonas aeruginosa*

Règne	Bacteria
Division	Proteobacteria
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	*Pseudomonadales*
Famille	*Pseudomonaceae*

Pouvoir pathogène

Les formes de pathologie qu'elle engendre sont diverses : infection de l'œil, des plaies telles que les brûlures et les plaies opératoires, des infections urinaires gastro-intestinales et des poumons **(120).**

Escherichia coli

Caractère bactériologique

- *Escherichia coli* est un bacille à gram négatif, radiorésistant de la famille des Enterobacteriaceae, asporulé.
- Sa taille varie en fonction des conditions de croissance (entre 0,5 à 3 µm) **(figure25)**, pesant de 0,5 à 5 picogrammes **(121)**.
- Il peut se déplacer au moyen de flagelles péritriches **(figure25)** comme il peut être immobile
- Les bactéries se développent sur gélose MacConkey (les colonies, rouges ou incolores, atteignent un diamètre de 2 à 3 mm).
- Elles peuvent croître dans des conditions aérobies ou anaérobies **(121).**

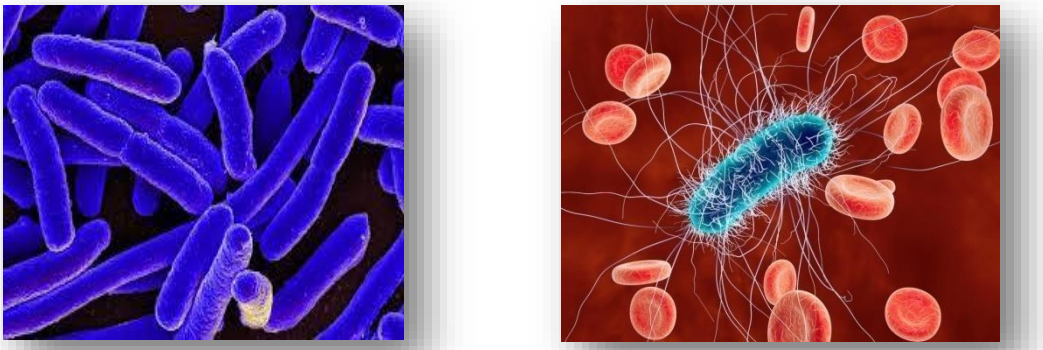


Figure 25 : Observation microscopique d'*Escherichia coli* **(120).**

Habitat

- *Escherichia 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).
- Ce germe se rencontre aussi au niveau de diverses muqueuses.

Classification

Tableau 05 : Représente classification classique d'*E.coli*

Règne	Bacteria
Division	Proteobacteria
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	*Escherichia*
Espèce	*coli*

Pouvoir pathogène

Escherichia coli peut provoquer plusieurs types d'infections, il se manifeste par une gastroentérite, mais peut également provoquer des infections de plaies péritonites et des voies urinaires, des méningites et l'insuffisance rénale **(122).**

Escherichia coli est aussi la cause fréquente de diarrhée du voyageur, qui peut se produire après avoir ingéré ou bu des aliments et de l'eau contaminés **(122).**

Partie Expérimentale

Chapitre VI
Matériels et méthodes

Objectifs de travail

L'objectif général de ce travail est d'étudier l'activité antibactérienne des extraits de *T. vulgaris* et de *T. serpyllum* sur les bactéries pathogènes

Lieu de stage

L'ensemble de travail a été effectuée au niveau de laboratoire de physiologie et nutrition; au laboratoire de microbiologie générale et de biochimie de l'université djilali liabes de faculté de science de nature et vie pendant une durée de un mois (mai –juin 2021)

I. Appareillage

- Hydro distillateur ou clenvenger
- Etuve
- Balance de précision
- Plaque chauffante
- Autoclave
- Vortex
- Centrifugeuse
- Bec bensen
- four pasteur
- agitateur
- Microscope optique

II. Matériels

- Boite de pétri 90mm
- Papier pH
- Tube à essai
- Pipette pasteur
- Pipette graduée sterile
- Pince stérile
- Portoir
- Becher
- Burette graduée
- Papier wattman
- Micropipette
- Eppendorfs
- Anse de platine

- Lame et lamelle
- Disque
- Les ambons
- Ecouvillon

III. Produits utilisé

A. Matériels végétaux

- Les feuilles de*Thymus vulgaris*
- Les feuilles de*Thymus Serpyllum*

B. Matériels microbiologique

Les germes testés

- *Staphylococcus Aureus*
- *Pseudomonas Aeroginosa*
- *Echerichia Coli*

C. Réactifs chimiques

- Hydroxyde de sodium KOH
- Potasse éthanolique à 0.2M
- Acide sulfurique à 0.25M
- Phénolphtaléine 1%
- Ethanol à 95%
- Tween 80
- Eau distillé
- Fushine
- Violet de gentiane

D. Milieux de base

- Gélose Mueller hinton
- Bouillon nutritifs

Matériel biologique

Ce travail est porté sur le *Thymus Vulgaris* et *Thymus Serpyllum.* Le choix de cette plante est lié d'une part à l'importance de cette espèce en tant qu'une plante médicinale et aromatique la plus

utilisée à travers le monde et d'autre part à leur à la forte utilisation de leur extrait des huiles essentielles dans la médecine traditionnelle

Récolte de la matière

Les plantes ont été récoltées au cours de mois de Mars 2021 dans la région Tessala à SBA

I. L'extraction d'HE de *T.vulgaris et de T.serpyllum*

A. Séchage des plantes

Les feuilles de *Thymus vulgaris et de T.serpyllum* fraichement récolté ont été séchée dans endroit sec ; aéré et dépourvu de soleil pendant 21 jour.une fois séché elles ont été récupérée dans des sacs en papier ; puis transportées au laboratoire physiologie et nutrition afin de commencer les procédés d'extraction **(123 ; 124).**

B. Extraction

Mode opératoire

L'extraction des deux plantes *thymus vulgaris* et *thymus serpyllum* ont été effectué par le clevenger .Avant lancement ; l'appareil a été rincé avec de l'eau distillé afin d'éliminer les poussiers et les graisse soient présenté dans appareil pour éviter contamination de huile au cours de l'extraction **(49).**

Cette méthode consiste à introduire 40g de matière sèche dans un ballon de 1Lcontenant 400ml d'eau distillé .l'ensemble est porté à ébullition pendant 1h30 par chauffe ballon .Les vapeurs chargées d'huile essentielle traversent le réfrigérant et se condensent ainsi avant de chuter dans une ampoule de décantation l'huile se séparé par la suite de l'eau par différance de densité **(105; 125).**

Apres l'extraction le volume essentielle obtenua été mesuré puis conservé dans un tube stérile .le tube a été couvert d'un papier aluminium a l'abri de lumière puis conservé dans un réfrigérateur à 4C jusqu'à son usage pour les tests chimiques et biologiques.

Figure 26: Représente la pesée de matière sèche

Figure27 : Représente appareil clevenger

Analyse Quantitative

- **Rendements**

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle (RHE), est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction (MHE) et la matière végétale utilisée (MS) **(45).** Il est donné par la formule suivante:

$$RHE\ (\%) = mHE / mS.100$$

RHE : Rendement de l'huile essentielle de *T. vulgaris* et de *T. serpyllum* en %.

mHE: Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme.

mS : Masse en gramme de la matière végétale sèche

- **Rendements moyens**

$$RHE = (RHE1 + RHE2 + RHE3 \cdots + Ri)/n$$

n: le nombre des extractions

Analyse qualitative

- **Caractérisation organoleptique**

L'aspect physique : l'aspect d'une huile dépend des produits qui la constituent, elle peut apparaître sous forme liquide, solide ou bien semi solide.

L'odeur : elle appartient aux sens chimiques les plus sensibles.

La couleur : la coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent, donc la couleur change d'une huile essentielle à une autre; elle peut être déterminée à l'œil nu.

I.E. Détermination des propriétés physico-chimiques

Aujourd'hui, les propriétés physico-chimiques des HE (densité, indice de réfraction, indice d'acide, indice d'ester) sont exigées pour leur évaluation commerciale **(126).**

- **Les propriétés physiques**

1. **L'indice de réfraction (127).**

L'indice de réfraction est le rapport de la vitesse d'un rayon lumineux (la raie D du sodium 589 nm) dans le vide et sa vitesse dans le milieu. Autrement dit, c'est la mesure de la réfringence d'un corps donné par rapport à la raie D de sodium.

Mode opératoire :

Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1,333 à 20°C. Ouvrir le prisme secondaire et déposer 2 à 3 gouttes de l'échantillon liquide sur la partie centrale du prisme principal. Fermer ensuite doucement le prisme secondaire

L'échantillon s'étale entre le prisme principal et le prisme secondaire en un film mince.

Attendre que la température soit stable à 20°C et effectuer la mesure.

L'indice de réfraction (IR), à la température de référence t est donnée par l'équation suivante :

$$I_{20} = I_t + 0.00045\ (t - 20C°)$$

I20: indice à 20°C.

It : indice à la température de chambre.

t : température de mesure.

2. Le pH

Le pH est exprimé par une valeur numérique. Il indique si une solution est acide ou basique, et représente aussi la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse **(128).** Le pH est déterminé à l'aide d'un papier pH

Figure 28 : boite des papiers pH

- **Propriétés chimiques**

1. L'indice d'acide (129).

L'indice d'acide est le nombre qui exprime en milligramme la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans un 1g de substance.

Mode opératoire

Peser 1g d'HE. Introduire la prise d'essai dans un ballon. Ajouter 2,5ml d'éthanol à 95% et 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine.

Titrer le liquide avec la solution d'hydroxyde de potassium (0,1N) jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistante pendant 30 secondes. Noter le volume de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé.

L'indice d'acide (I.A) est donné par l'équation suivante :

$$I_A = 5.61\ (v/m)$$

v: volume (ml) de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé pour le titrage.

m: masse de la prise d'essai.

I20 = It + 0.00045 (t – 20C°)

2. L'indice de saponification

L'indice de saponification d'un corps gras est le poids de KOH exprimé en milligramme pour neutraliser les acides gras provenant de l'hydrolyse de 1 g de ce corps gras, la réaction de saponification aura lieu quand les acides gras libérés se combinent avec la potasse pour donner un savon **(130).**

Mode opératoire

Choisir 2 ballons à saponification, qui s'adaptent au bouchon du réfrigérant **(figure29)**. Peser le ballon à saponification. Introduire à l'aide de la pipette de 1 ml un volume de 0,5 ml d'huile essentielle de *T. vulgaris* et repeser **(figure30).** Déterminer la masse (**m**) de l'huile essentielle. Ajouter 10 ml de KOH alcoolique à la pipette et agiter le contenu du ballon **(figure31).** Poursuivre la saponification 30 minutes. Ajouter 5 gouttes de phénolphtaléine **(figure32)** et doser la potasse en excès par l'acide sulfurique H2SO4 à 0,25N et noter **V1 (figure 33).** En parallèle, verser la même quantité de KOH dans le 2ème ballon à saponification (témoin), chauffer pendant 30 minutes sous réfrigérant. Ajouter 5 gouttes de phénolphtaléine. Doser la potasse par l'acide sulfurique H2SO4 à 0,25N et noter **V2**.

L'indice de saponification est donné par la formule suivante:

$$I_s = M\,(KOH) \times T \times (V2 - V_1)/m$$

M: masse molaire de KOH.

V1: volume de la solution d'acide sulfurique H2So4 utilisée pour le corps gras.

V2: volume de la solution d'acide sulfurique H2So4 utilisée pour l'essai à blanc.

T: normalité de la solution d'acide sulfurique H2So4 utilisée.

m: masse en gramme de prise d'essai.

Figure29 : Représente appareil de saponification le réfrigérant

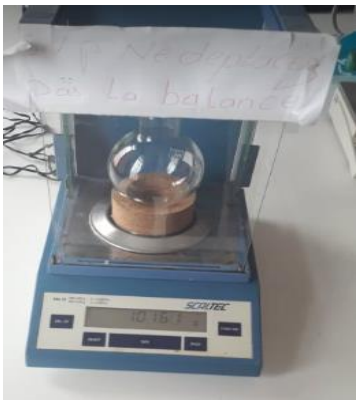


Figure30 : Représente pesé d'HEs de *T.vulgaris et T.serpyllum*

Figure 31: Représente agitation de KOH alcoolique

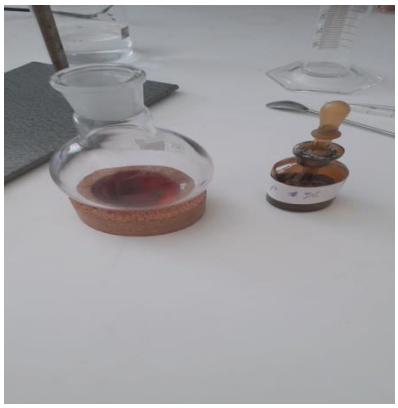


Figure32 : le virage de couleur après l'ajout de phenolophtaleine

Figure 33: titrage des HEs par l'acide sulfurique H_2SO_4

3. L'indice d'ester (131).

L'indice d'ester (IE) est le nombre qui exprime en milligramme la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides libres par l'hydroxyde des esters présents dans 1 g de substance. Selon la norme de la **pharmacopée européenne, (2001)** l'indice d'ester est donné par la relation suivante :

$$IE = Is - IA$$

4. La densité (132).

Elle constitue un point de repère important car sa valeur permet d'avoir une idée sur la composition chimique de l'HE. La densité est donnée par l'expression suivante :

$$d = m2 - m0 / m1 - m0$$

m0 : la masse du flacon vide.

m1 : la masse du flacon rempli d'eau distillée.

m2 : la masse du flacon rempli d'HE

5. La densité relative

La densité d'une huile est le rapport de la masse d'un certain volume d'une huile à 20° C **(133).**

Ou

$$D\frac{20}{20} = \frac{m}{m0}$$

m : la masse en gr de l'huile

m0 : la masse en gr de l'eau distillé

Isolement et identification des souches pathogènes

Prélèvement d'*E.coli.*

Le prélèvement correspondait aux urines ; isolées essentiellement dans le laboratoire de bactériologie du CHU de SBA.

Chez les sujets coopératifs

L'urine doit être recueillie dans un récipient stérile et sec ne contenant pas de traces de détergent ou d'antiseptique

Après lavage hygiénique des mains et toilette soigneuse au savon ou antiseptique doux de la région vulvaire chez la femme et du méat chez l'homme suivi d'un rinçage, éliminer le premier jet (environ les 20premiers millilitres) d'urines pour ne recueillir dans le récipient stérile que les urines du deuxième jet en prenant soin de ne pas toucher les bords supérieurs du récipient.

Chez les sujets non coopératifs

Le sondage vésical est réservé aux grabataires ; comateux ; oliguriques ou en rétention aigue. Il est réalisé avec une sonde stérile, le manipulateur doit être muni décanaux stériles.

Transport des urines

Le transport au laboratoire doit être effectué dans des conditions adéquates, en respectant la durée et la température (moins de 2 heures et à température ambiante) afin d'éviter une éventuelle contamination qui par la suite gênera l'interprétation de l'ECBU .Pour éviter la multiplication bactérienne, la mise en culture doit être adressée rapidement au laboratoire ou une conservation de l'échantillon à 4°C doit être utilisée.

Ensemencement

On procède directement à une recherche de germes et cela en déchargeant en stries condensées l'écouvillon de prélèvement sur toute la surface de la boite gélosée par la gélose Hektoen pour l'isolement des entérobactéries.

Isolement et purification

Après une lecture morphologique, les différentes colonies obtenues sont ré-isolées sur le même milieu afin d'obtenir des souches pures.

Techniques utilisées pour l'identification des bactéries

L'identification des souches a porté sur une série de tests préliminaires (examen macroscopique et examen microscopique)

Tests préliminaires

Examen macroscopique

Cet examen sert à orienter le diagnostic, il consiste en une observation des colonies en mentionnant l'aspect des colonies, la couleur, la forme, la consistance, l'odeur et diamètre de ces dernières.

Examen microscopique

Coloration de Gram

C'est la coloration de base en bactériologie et permet de rechercher l'affinité tinctoriale des bactéries leurs morphologies et leurs modes de regroupement. Elle permet une classification des bactéries selon leur structure. La lecture se fait au grossissement x 100 avec une goutte d'huile à immersion. Les bactéries à Gram positif apparaissent colorées en violet, alors que les bactéries Gram négatif sont roses.

Etape de coloration de gram

- Réaliser un frottis ou un étalement
- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50-60° (brièvement supportable à la main), ce qui la sécher puis laisser refroidir la lame. Immerger (ou inonder) la lame dans une solution de Cristal violet pendant 1min.
- Laver à l'eau en traversant la lame ou sous le robinet.
- Immerger la lame dans le lugol pendant 1min.
- Laver à nouveau à l'eau
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler
- goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant la lame pendant une dizaine secondes dans le décolorant.
- Laver à l'eau
- Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50°. La lame doit être parfaitement sécher. Observer à l'objectif ×100, en immersion avec de l'huile à immersion.

Test biochimique

L'identification des souches est réalisée par l'étude de plusieurs tests biochimiques et métaboliques (test de catalase ; test TSI ; test de mobilité ; test de citrate)**.ANNEXE 01**

Préparation de l'inoculum

Une colonie bactérienne est prélevée, à partir d'une culture jeune de 18-24 h, et est transférées dans l'eau physiologique stérile. Bien homogénéiser la suspension bactérienne.

Inoculation de la galerie

A l'aide d'une pipette pasteur, les tubes sont inoculés par la suspension bactérienne déjà préparés en évitant d'introduire les bulles d'air.

Figure34 : Galerie des tests biochimiques d'*E.coli* (Témoin).

Prélèvement de *Staphyloccocus aureus*

Échantillons prélevés à partir de produits laitiers (lben)

Conservation des échantillons

Les échantillons prélevés ont été refroidis rapidement en les déposant sur de la glace ou au réfrigérateur pour être transportés au laboratoire dans une glacière dans une durée qui ne dépasse pas 2 heures.

L'enrichissement *Staphylococcus aureus*

Pour l'enrichissement des échantillons, le bouillon de Giolitti Cantoni (GC) est utilisé pour *Staphylococcus aureus* dans les denrées alimentaires .A l'aide d'une micropipette, 1 ml / 1mg de l'échantillon est ajouté à 9 ml de GC + tellurite de potassium. Le milieu est recouvert avec une fine couche d'huile de paraffine stérile pour l'anaérobiose. La lecture se fait au terme de l'incubation à 37°C entre 24 à 48 heures

Isolement de *Staphylococcus aureus*

La gélose de Baird Parker (BP) additionnée de jaune d'œuf et de tellurite de potassium est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement de *Staphylococcus aureus*. A partir du milieu GC (avec noircissement), un ensemencement par stries est réalisé sur le milieu Baird Parker .L'incubation se fait de 24 à 48 heures à 37° C .Un résultat positif consiste à avoir des colonies au centre noir, entourées d'un halo clair.

Purification des isolats

Cette étape est importante afin de purifier toutes les souches isolées auparavant. A l'aide d'une anse de platine on prélève une colonie bien isolée et défini (un centre noir avec un halo clair) sur le milieu Baird Parker puis on la décharge dans un tube qui contient 9 ml de bouillon nutritif. L'incubation se fait à 37°C pendant 48h. Cette étape est refaite plusieurs fois (2 à 3 fois) afin d'avoir des souches pures

Tests préliminaires

Etude macroscopique

Consiste à étudier la forme, l'aspect, le contour, la surface et la couleur des colonies sur les milieux BP et Chapman

Etude microscopique

Après une coloration de Gram une observation microscopique des souches isolées est réalisée dans le but de déterminer la morphologie et le type de Gram (+ ou -).

- **Coloration de Gram**

Cette technique de coloration est utilisée dans l'étude et la classification des bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et à Gram négatif

II.B.5. test biochimique

Dans cette étude, toutes les souches à Gram + et Catalase + sont retenues. Pour la suite de L'identification des souches est réalisée par l'étude de plusieurs tests biochimiques et métaboliques (test catalase ; test TSI ; test de citrate) **(annexes I).**

II.C. La 3eme germes *Pseudomonas aeruginosa* qui a été testé pour déceler l'activité antibactérienne des extraits de *T. vulgaris* et de *T. serpyllum* on l'a ramené de laboratoire de CHU Hassini Abdelkader Sidi Bel Abbes.

II. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. vulgaris et T. serpyllum* sur la croissance des bactéries pathogènes.

III.A. Technique d'aromatogramme sur milieu solide

Principe

La méthode de diffusion sur disque, appelée aussi méthode de Vincent ou technique de l'aromatogramme mise au point par Schroeder et Messing en 1949. Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques, préalablement sélectionnées et reconnues **(134).**

La réalisation de cette méthode repose sur le principe de l'antibiogramme **(111).** Des disques stériles de papier Wattman de 6 mm de diamètre, contenant 10 µl d'extraits à tester, sont déposés

à l'aide d'une pince stérile à la surface d'un milieu gélosé approprié pour chaque souche, préalablement ensemencé avec une suspension bactérienne (108 UFC/ml). Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 20 min avant d'être incubées à 37°C pendant 24h **(42 ; 125).**

Mode opératoire

III.A.1. Préparation de la suspension bactérienne

- A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement (ayant au maximum 24h), racler à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur scellée, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. **(figure 35.A)**
- Décharger l'anse ou la pipette pasteur dans un tube contenant un bouillon nutritif (**figure 35.B).**
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne (une suspension d'opacité équivalente de 0,5 Mc Ferland).
- Incubation pendant 24h à 37°C. **(figure36)**
- Centrifugation 4000 tours pendant 15 min. **(figure 37)**

  Récupération de surnagent

Figure35 : Préparation des suspensions bactériennes

Figure36: Représente incubation des suspensions bactériennes à 37°C pendant24h

Figure37: Représente centrifugation des suspensions 4000tr à 15min

I. b) Préparation des milieux de culture

Le milieu de culture utilisé pour le test de l'aromatogramme est le milieu Mueller-Hinton (MH). Le procédé consiste à couler la gélose MH dans des boites de pétri stérile de diamètre (90mm) à une épaisseur de 4 mm et puis les laisser refroidir et solidifier à une température ambiante. **(Figure 38)**

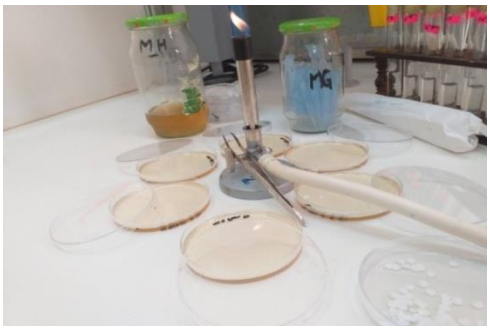


Figure38 : préparation des boites pétries en coulant MH

I. c) Préparation des différentes concentrations d'HE

Il s'agit de préparer une solution mère de Tween 80 pure pour réaliser les différentes dilutions d'huile essentielle. Le procédé consiste à diluer 2.5ml de Tween 80 pure dans 90ml d'eau distillée, cette solution est stérilisée à 120°C pendant 15 min **(Figure 39).**

Dans un volume de 9ml de cette solution, nous avons ajouté aseptiquement 1ml d'HE, puis après avoir agité au vortex le contenu **(figure40)**, afin d'obtenir une solution bien homogénéisée, nous avons réalisé des dilutions successive de 10^{-1} à 10^{-6}**.**

Figure39 : Stérilisation de tween 80 à 120°C pendant 15min

Figure 40: agitation de solution mère (tween 80 avec huile) au vortex

III.A.4. Préparation des disques d'HE de *T. vulgaris et T. serpyllum*

Les disques sont préparés à partir du papier wattman de 6 mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 min, puis immergés dans les extraits des HE de *T. vulgaris* et *T. serpyllum* séchés à une température ambiante.

III.A.5. Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans le surnagent de la suspension bactérienne.
- Essorer l'écouvillon en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération deux fois, en tournant la boite de pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boites de pétri il recharger l'écouvillon à chaque fois.
- Laisser sécher à température ambiante pendant 15min.

III.A.6. Dépôt des disques

A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier Wattman préalablement imprégnés d'huile essentielle ont été placé à la surface des boites de pétri ensemencées **(figure 41),** et ne pas déplacer les disques après l'application et enfin Les boites sont incubées à 37°C pendant 24h ou 48h**(figure42)**

Figure 41: Représente dépôt des disques stériles à la surface des boites pétries ensemencé

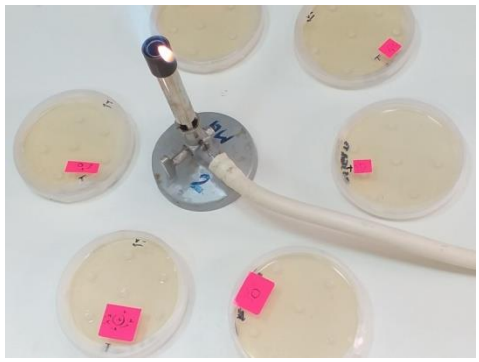


Figure42 : Incubation les boite après le dépôt des disques à 37°C pendant 24h

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition, mesuré à l'aide d'une règle en (mm) (y compris le diamètre de disque de 6mm). L'importance des diamètres des zones reflète l'impact de l'huile essentielle sur les souches testées **(135 ; 125).**

Lecture de résultat

Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité **(102; 44).**

(-) souche résistante (D < 8 mm)

(+) souche sensible (9mm ≤ D ≤ 14mm)

(+ +) souche très sensible (15mm ≤ D ≤ 19 mm)

(+ + +) souche extrêmement sensible (D >20 mm)

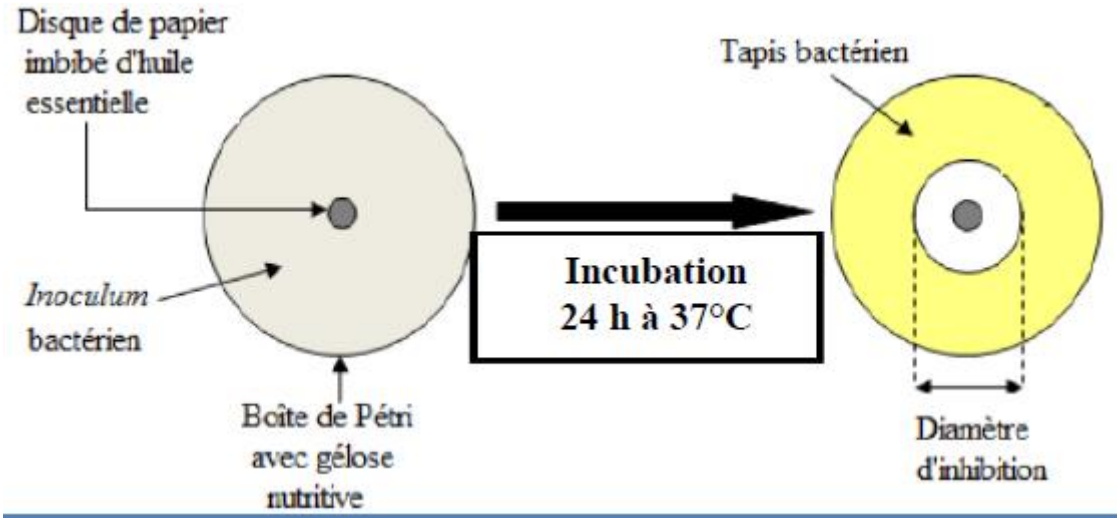


Figure43 : Principe de la méthode de diffusion par disque **(124).**

Chapitre VI:
Résultats et discussion

Analyse quantitative

Rendement en huile essentielle

Les valeurs indiquant la moyenne des rendements en huiles essentielles des deux plantes étudiées sont illustrées par la **figure et le tableau ci-dessus**

Tableau 06 : Représente taux de rendement des HEs de *T.vulgaris et*

Espèce	**Poids d'huile fixe (g)**	**Poids de matiere vegatal**	**Rendement %**
T.vulgaris	**0.77**	**50**	**1.5%**
T.serpyllum	**0.8**	**50**	**1.6**

Analyse qualitative

Caractère organoleptique

Les caractéristiques organoleptiques de nos huiles essentielles sont présentées dans **(Tableau 05)** et (**figure 44 et 45).**

Tableau07: Représente caractéristiques organoleptiques des HEs de *T.vulgaris et T.serpyllum*

Espèce	**Aspect**	**Couleur**	**Odeur**	**Saveur**
T.vulgaris	Liquide	Jaune claire	Aromatique acré caractéristique de l'espèce végétale	Très Piquante indétectable
T.Serpyllum	Liquide	Jaune foncé	Fortement aromatique,	piquante

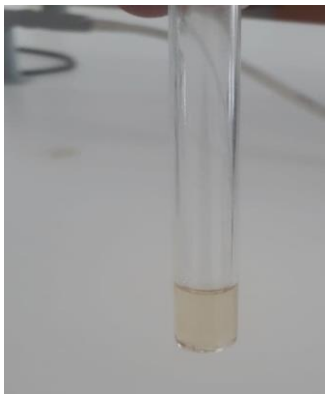


Figure44 : Représente extraction d'huile de *T. serpyllum*

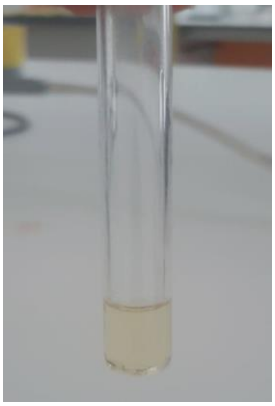


Figure 45: Représente extraction d'huile de *T.vulgaris*

A. Caractéristiques physico-chimiques

- **Caractéristique physique :**

Tableau08: Représente valeur de pH des HEs de *T.vulgaris et T.serpyllum*

Espece	pH
T.vulgaris	6
T.seryllum	5

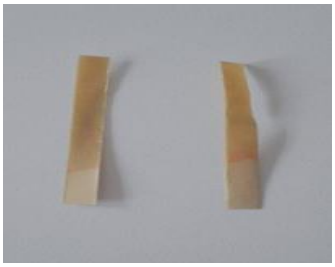


Figure46: Résultats de pH

- **Caractéristique chimique**

Tableau 07 : Représente caractéristiques chimiques des HEs de *T.vulgaris et T.serpyllum*

Espece	**Indice de saponification**	**Indice d'acidité**	**Indice d'ester**	**Densité**
T.vulgaris	**10.51**	**7.01**	**3.5**	**0.79**
T.serpyllum	**11.92**	**6.23**	**5.69**	**0.85**

Figure 47 : Représente résultat de saponification (virage de couleur)

Isolement et identification des souches pathogènes

Tests préliminaire

Examen macroscopique

Sur milieu Hektoen

L'aspect des colonies sur milieu Hektoen est en relation de la capacité des microorganismes à fermenter le lactose mis dans le milieu. Cela conduit à une production d'acide qui abaisse le pH et modifie l'indicateur de pH placé dans le milieu qui vire du vert au jaune-orangé, donc Escherichia coli est lactose positif.

Figure 48: Représente aspect d'*Escherichia coli* sur Hektoen

Sur milieu GN

Escherichia coli apparait en colonies de 2-3 mm de diamètre non pigmentées, brillantes, opaques, blanchâtres et bien rondes à surface lisses plus un point ombiliqué central.

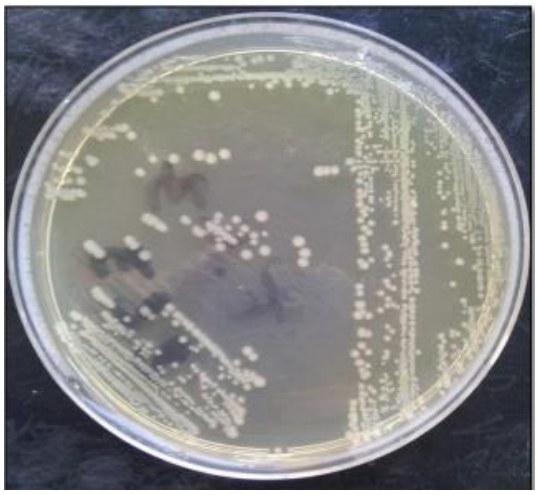


Figure 49 : Représente aspect macroscopique *d'Escherichia coli* sur GN.

Aspect microscopique

Coloration de Gram

Les résultats obtenus par observation microscopique après coloration de Gram, montre que *Escherichia coli* se présente sous forme de bacilles ou diplobacilles et parfois en amas colorés en rose. Donc *Escherichia coli* est un bacille à Gram négatif.

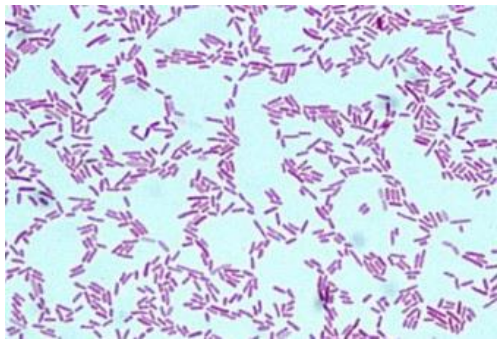


Figure 50 : Bacilles Gram négatif (coloration de Gram)

Test biochimique

Test de catalase

Figure 51: Test de catalase positif

Test TSI

Après l'incubation, on a remarqué que pour les cinq souches d'*Escherichia coli* étudiées il y a eu une acidification dans la pente et le culot, d'où le virage du rouge diphénol au jaune avec présence des bulles d'air, parfois décollement de la gélose et absence de noircissement.

Donc les cinq souches sont: lactose et saccharose (+) , glucose (+), gaz (+) , H_2S (-).

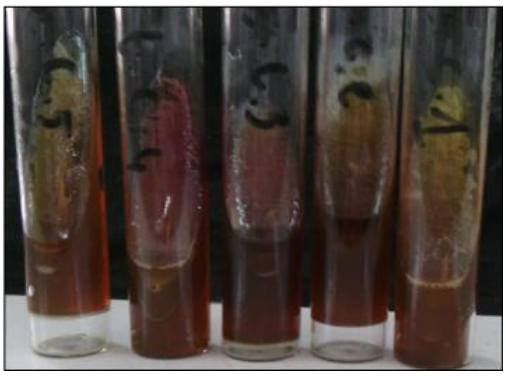


Figure52 : Représente aspect du milieu TSI (test positif).

Utilisation de mannitol et test de mobilité

Les résultats qu'on a obtenus montrent que pour les cinq souches d'*Escherichia coli* il y a eu une acidification du milieu, d'où le virage du rouge de phénol au jaune. Donc les cinq souches sont mannitol(+).

En ce qui concerne la mobilité, les bactéries ont diffusé à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble, ce qui montre qu'*Escherichia coli* est mobile. Donc on note mobilité (+).

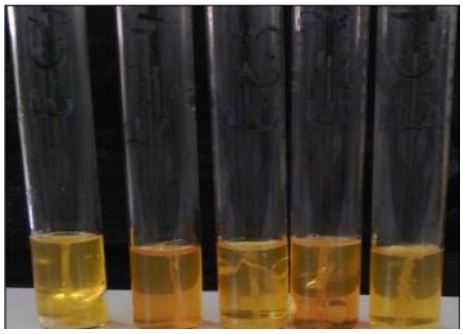
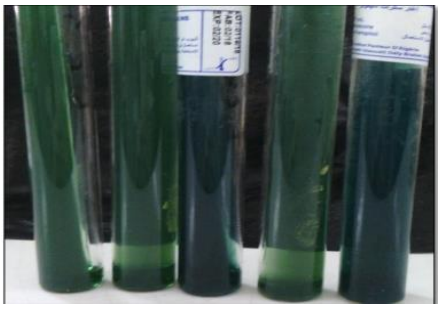


Figure53 : Représente aspect du milieu mannitol-mobilité (test positif).

Recherche de l'utilisation de citrate

Après 24h d'incubation on n'a pas observé un virage de couleur du vert au bleu, ce quisignifie qu'y a pas eu une alcalinisation du milieu et que les bactéries n'ont pas utilisé lecitrate comme seule source de carbone et d'énergie.

Donc *Escherichia coli* ne possède pas une citrate perméase et est dite citrate (-).



Fiqure54 : Représente aspect du milieu citrate de Simmons (test négatif).

Enrichissement de *Staphyloccocus Aureus*

Figure55: Représente résultats d'enrichissement sur milieu GC pendant 24 h à 37°C

Après incubation sur milieu Giolotti Cantoni les tubes doivent présenter un noircissement ou une couleur grisâtre.

Isolement de *Staphyloccocus aureus*

Figure56: Représente résultat positif d'ensemencement par des stries sur gélose Chapman

Les souches ont été ensemencées par des stries sur la gélose Chapman, et incubées à 37°C pendant 24h. On observe des colonies blanches avec virage de la couleur du milieu ce qui signifie probablement une souche de *Staphylococcus aureus.*

Purification de *Staphyloccocus aureus*

Figure 57: Représente purification sur BN

Coloration de Gram

Les résultats de la coloration de Gram des isolats ont révélé que les 47 isolats sont Gram+, *Staphylococcus aureus* se présente sous forme d'une grappe de raisin

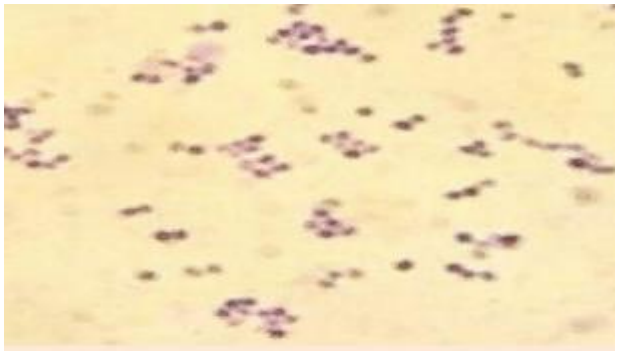


Figure 58 : Observation d'un isolat sous Microscope Optique, grossissement X100.

Tests biochimique

Test de catalase

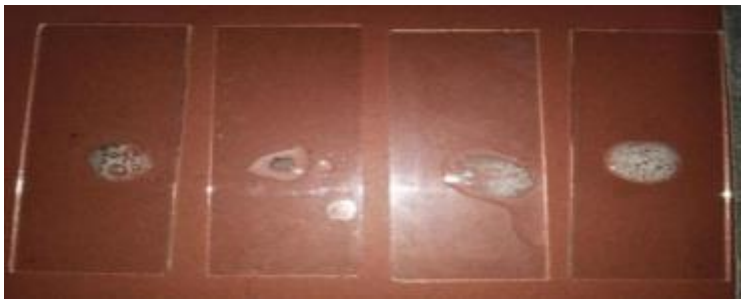


Figure 59: Test de catalase positif

Test TSI

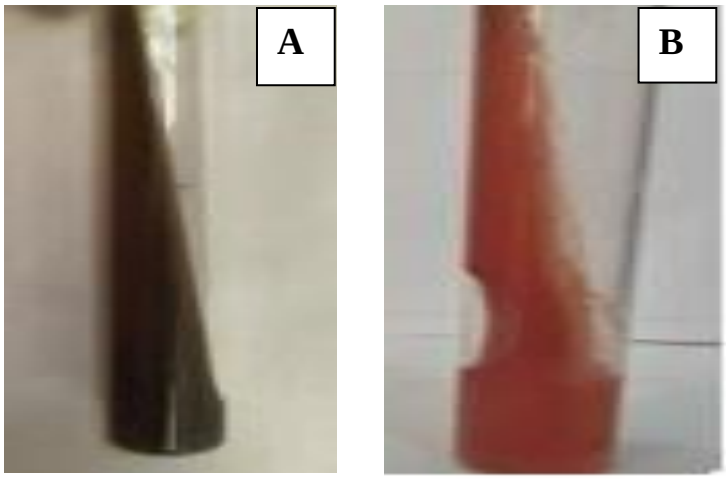


Figure 60: Représente résultat de test TSI positif (A) avant incubation, (B) après incubation

Test Citrate de Simmons

Figure 61: Représente résultats du test CS, (A) : Avant incubation, (B) : Après incubation

Virage de l'indicateur de pH au bleu : il y a eu alcalinisation du milieu ce qui signifie que la souche est citrate de Simmons (+), Pas de virage de couleur

Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. vulgaris et T. serpyllum* sur la croissance des bactéries pathogènes.

I. Technique d'aromatogramme sur milieu solide

I. a) Préparation des suspensions

.

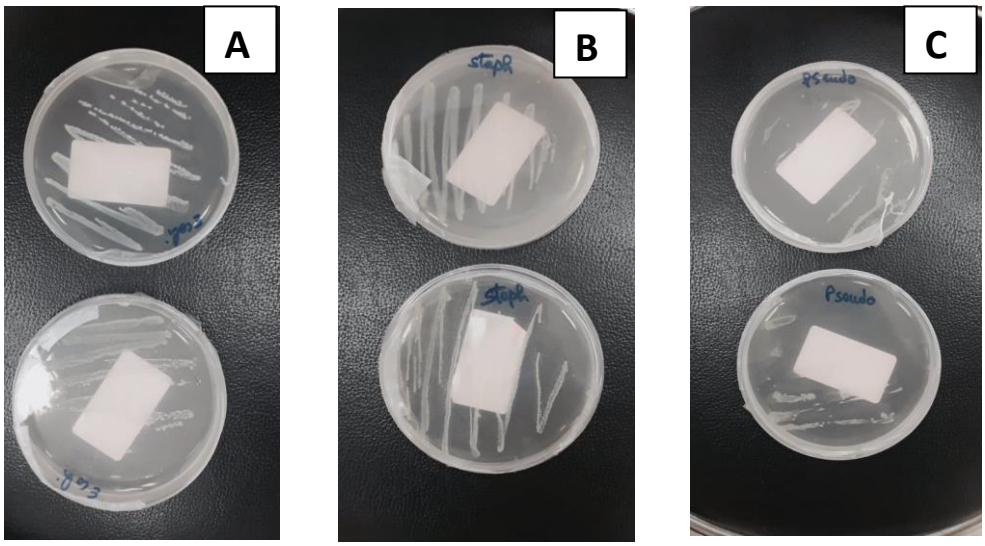


Figure 62 : Représente résultats de culture pure sur mileu GN après 18h d'incubation (A) *E.coli* ; (B) *Staphyloccocus aureus* ;(C) *Pseudomonas aeroginosa*

I

Figure 63 : Représente résultats des suspensions après l'incubation

III.A.3. Résultats Préparation des différentes concentrations d'HE

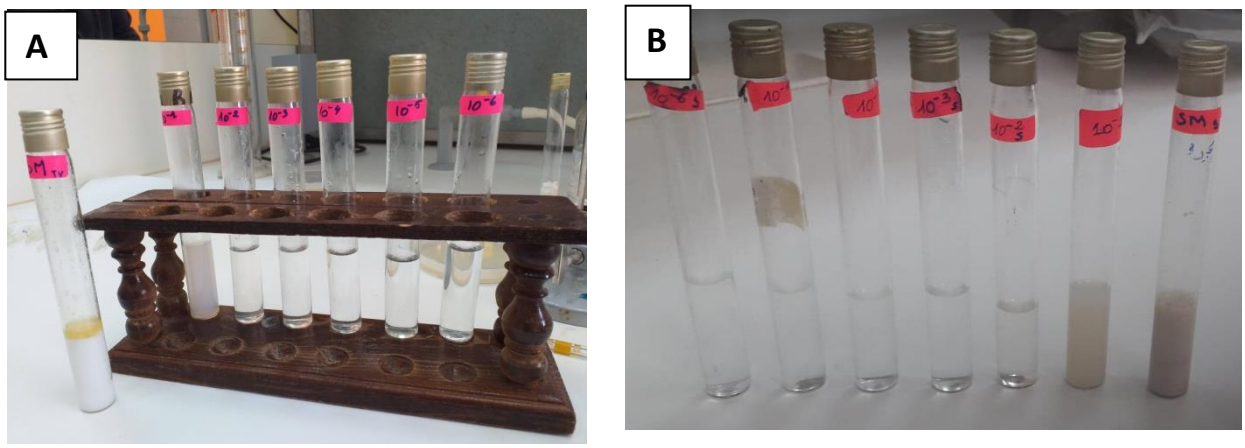


Figure64: Dilutions de 10^{-1} jusqu'à 10^{-6} (A) *T.vulgaris* (B) *T.serpyllum*

Aromatogramme

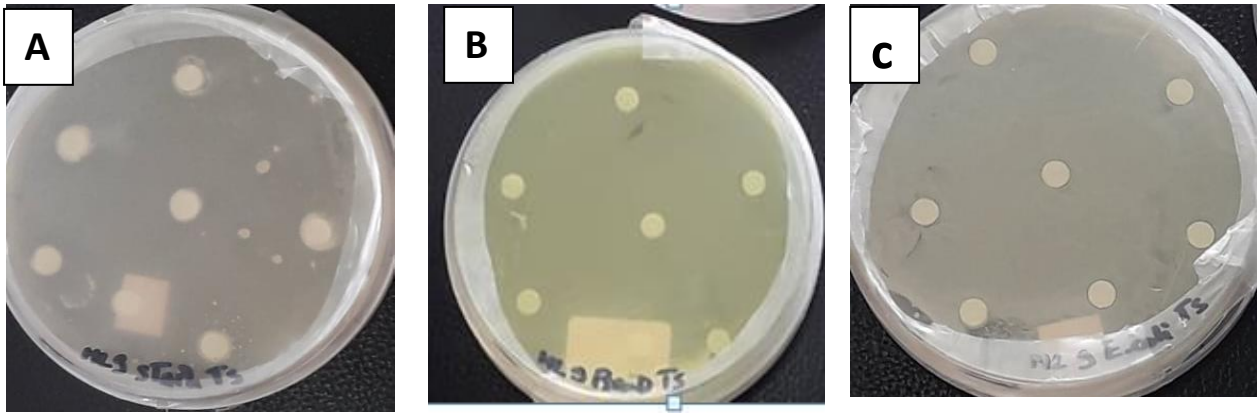


Figure 65 : Représente résultats d'aromatogramme de *T.serpyllum* (A) *Staphyloccocus aureus* ; (B) *Pseudomonas aeruginosa*;(C) *E.coli*

Tableau 10 : Représente résultats d'aromatogramme de *T.serpyllum*

Souche	Témoins	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6
E.coli	0	7mm	7mm	7mm	7mm	7mm	7mm
Staphylococcus aureus	0	5.5mm	6mm	6mm	6mm	6mm	7mm
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	0	0	0	0

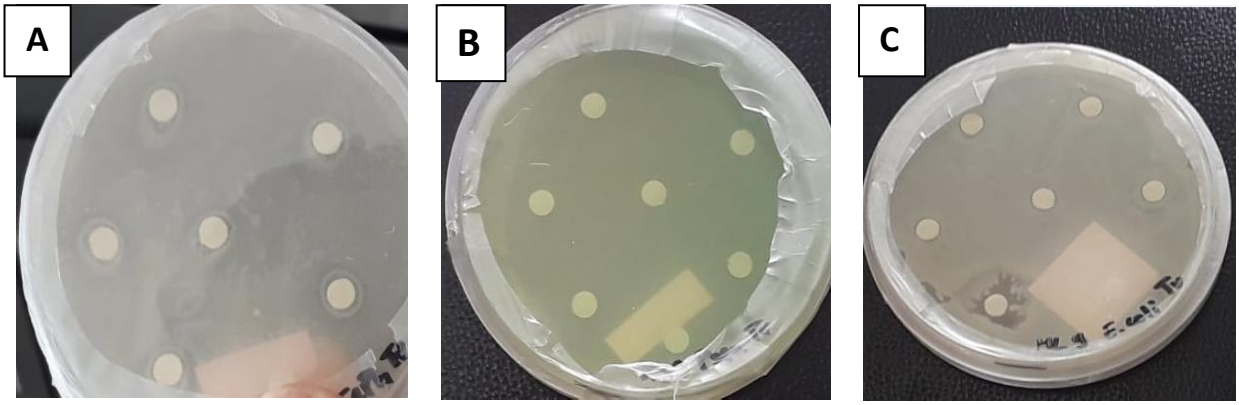


Figure66 : Représente résultats d'aromatogramme de *T.vulgaris*(A) *Staphyloccocus aureus* ; (B) *Pseudomonas aeruginosa* ET (C) *E.coli*

Tableau 11 : Représente résultats d'aromatogramme de *T.vulgaris*

Souche	Témoins	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6
E.coli	0	11mm	10mm	7mm	7mm	6mm	6mm
Staphylococcus aureus	0	6mm	6mm	6mm	6mm	6mm	6mm
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	0	0	0	0

Discussion

Le rendement obtenu en huile essentielle des feuilles sèches du *T. vulgaris* est de 1.5%, alors que celui des feuilles sèches de *T. serpyllum* est de 1.6 %, comme le montre les résultats du **tableau 06.**

Une autre étude faite par Bouguerra **(136)** sur la plante *T. vulgaris* de Blida a donné un taux de 1.58%. Le rendement de *T. serpyllum* (1.47%) de Chlef est proche de cette valeur. Une étude réalisée en 2017 par Abdelli, a permis d'obtenir des rendements moyens en huiles essentielles à partir des feuilles sèches de *T. vulgaris* de Tlemcen et de Mostaganem allant respectivement de 4.2 à 2.2%. Ces résultats sont cependant supérieurs aux rendements de nos huiles.

Les variations du rendement des huiles essentielles peuvent être liées au choix de la période de récolte ; la zone géographique de collecte, le climat, la génétique de la plante, l'organe utilisé, le stade de développement degré de fraîcheur, la période de séchage, la méthode ainsi que le matériel d'extraction utilisés **(45 ; 52;125)**.

Les paramètres physico-chimiques diffèrent suivant l'origine de l'huile essentielle, nos résultats ont été mis en parallèle avec ceux de binate gaoussou et dikes loubna de wilaya Chelf.

Tous ces paramètres sont influencés par les conditions édaphiques, climatique ainsi que les conditions de culture des plantes **(137).**

Le pH obtenu indique que nos HE sont légèrement acides

Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acide gras libres, ce paramètre peut nous aider à connaitre la qualité de nos produits. L'indice acide de nos huiles est de 7.01 pour *T. vulgaris* et de 6.23 pour *T. serpyllum* en comparaison à ceux de *T. vulgaris et t serpyllum de la wilaya* M'sila et Chlef respectivement ; ont donnée des résultats de 2.24 et 2.80 respectivement.

Un produit avec un indice d'acidité faible est un produit de bonne qualité. En effet une huile fraîche ne contient que très peu d'acides libres. C'est pendant la période de stockage que l'huile peut subir des dégradations telle l'hydrolyse des esters **(138).** Indice de saponification de nos huiles essentielles de *T vulgaris et T serpyllum* est de 10.51 et11.92 respectivement tandis que la valeur Is de ces HEs de wilaya M'sila et chlef ont donné une valeur de 10.96 et 11.22

Plus l'indice de saponification de l'HE est élevé plus son poids moléculaire est faible.

Les valeurs de l'indice d'ester de *T. vulgaris* et de *T. serpyllum* sont faibles comparativement à ceux enregistrée en wilaya M'sila et Chlef

La densité de nos HEs est de 0.79 pour *T. vulgaris* et de 0.856 pour *T. serpyllum*

Le pouvoir antibacterien de l'HE de *T.vulgaris* et *T. serpyllum* de Tessala wilaya de SBA été évalué grâce à la technique de aromatogramme. Elle a révélé que les composants de cette HE de *T.vulgaris* ont effet bactéricide sur *E.coli* dans la solution 10^{-1} et 10^{-2} qui ont un diamètre de 11 à 10mm respectivement de par contre le reste de solution huileux sur *E.coli* et sur *Staphylococcus aureus* ont un diamètre de zone d'inhibition est de 6 à 7 mm et d'après la lecture de résultats si le D < à 8 mm donc la souche est résistante et *Pseudomonas aeruginosa* n'as montré aucun effet elle avait un diamètre de 0mm cette souche elle est résistante envers *T.vulgaris* .

L'HE *T.serpyllum* le diamètre d'inhibition des trois souches pathogènes *E.coli ; Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* varie de 7 ; 6 et 0 mm respectivement.

Tandis que ces trois souches ont montré une sensibilité extrême face aux deux huiles essentielles extraites respectivement des feuilles sèches de *T. vulgaris* région de Kaf sehab, wilaya de M'sila et de *T. serpyllum* d'Oued el fedha, wilaya de Chlef. Les diamètres des zones d'inhibition varient de 27.20 à 77.80 mm pour l'HE de *T. vulgaris* et de37.80 à 63.50 mm pour l'HE de *T. serpyllum*. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère donc d'une bactérie à une autre et d'une huile à une autre.

Conclusion et perspective

Conclusion

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

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

L'Algérie possède une position géographique particulière lui accordant une large bande de végétation très variée notamment les plantes aromatiques médicinales. La flore algérienne recèle un patrimoine végétal très riche, mais peu connu par manque d'études sur les vertus et les richesses qu'il peut probablement engendrer, celui-ci est malheureusement très peu exploité parmi cette flore Algérienne on retrouve *Thymus vulgaris et Thymus serpyllum* qui constituent une véritable alternative à l'utilisation des antibiotiques. En effet, notre étude s'est portée d'une part sur l'activité antibactérienne des extraits de *Thymus vulgaris* et de *Thymus serpyllum* vis-à-vis aux bactéries pathogènes.

Le présent travail a été consacré sur l'extraction de l'huile essentielle de *T. vulgaris et Thymus serpyllum* de la région Tessala de SBA et l'étude de leurs propriétés antimicrobiennes contre les bactéries pathogènes telles que *E.coli ; Pseudomona aeruginosa et Staphylococcus aureus.*

Le rendement des HEs des *T. vulgaris et Thymus serpyllum* est de 1.5% et 1.6% respectivement pour une quantité de 40g de matière végétale sèche.

Les propriétés organoleptiques d'huile essentielle de *T. vulgaris* montrent un aspect liquide et mobile avec une couleur jaune claire et une odeur aromatique acré avec un gout très piquante indétectable tandis que *Thymus serpyllum* montrent un aspect liquide et mobile avec une couleur jaune foncé et une odeur Fortement aromatique, avec un gout piquante.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode de l'aromatogramme n'a pas montré un effet bactéricide important de solution HE de 10^{-1} et 10^{-2} de *T.vulgaris* sur *E.coli*, les diamètres des zones d'inhibition varient de 10 à 11 mm par contre les autres solutions n'ont pas montré un effet bactéricide sur les deux souches pathogène *Staphylococcus aureus* et *pseudomonas aeruginosa* avec des zones d'inhibition qui sont de 5.5 à 7 mm de diamètre.

Perspectives

Ces résultats restent préliminaires et afin de les approfondir, d'autres approches et études sont souhaitables à réaliser, il serait intéressant de :

- Elargir le spectre des microorganismes (autres souches bactériennes, levures, champignons) et l'utilisation d'autres techniques pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.
- Comparer les diamètres d'inhibitions des huiles essentielles à ceux des antibiotiques,
- Etablir des synergies de différents composés de diverses plantes en plus d'étudier d'autres propriétés biologiques de ces plantes, à savoir les propriétés anti-inflammatoires, antivirales, antiparasitaires et insecticides.
- De même d'autres études de l'association « huiles essentielles/antibiotiques » sont recommandées afin d'aller plus loin dans la recherche concernant ce domaine.
- Nous recommandons également une étude de conception d'une formule médicamenteuse qui combine entre les antibiotiques et les huile essentielle présentant des effets synergiques en association et ce dans le but de lutter contre les bactéries manifestant une résistance aux agents antibactériens.

Références Bibliographiques

(1) Dutertre J., 2011. Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste. Thèse. Doc. Univ. Bordeaux 2 - Victor Segalen. U.F.R des sciences médicales.120p.

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

(3) Chemar K., 2016 – Etude ethnobotanique de quelques plantes médicinales spontanées de la région EL Outaya. Mémoirede Mester, Univ. Med Khider, Biskra, 8-11

(4) OMS : organisation mondiale de la santé.

(5) C. L'Aromatherapie & Les huiles essentielles [Livre En ligne]. 2007 [consulté en Mars 2018]. Disponible sur : http://www.doc-developpement-durable.org).

(6) Girard G. LES PROPRIETES DES HUILES ESSENTIELLES DANS LES SOINS BUCCO-DENTAIRES D'HIER A AUJOURD'HUI [These]. Nancy : Université Henri Poincare ; 2010).

(7) Macheix J.J., Fleuriet A. et JAY-allemend C., 2005 – Les composés phenoliques des végetaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Ed. Presses polytechnologiques et universitaires romandes, France, 192 p.

(8) Jean Bruneton. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3emeédition ,1999 .édition tec et doc.

(9) Aref M. et Heded M., 2015 : Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologique (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médecinale Cleome arabica L (Région d'Oued Souf).Université echahid hamma lakhdar d'el-oued faculté des sciences de la nature et de la vie département de biologie cellulaire et moléculaire.59 pages.

(10) Yusuf Y., 2006 : Trends Food Sci. Tech. p17, 64-71.

(11) Nkhili, Ez., 2009 : Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Diplôme de Doctorat,Spécialité: Sciences des Aliments. Université Cadi Ayyad. MarrakechUniversité D'avignon Et Des Pays De Vaucluse Ecole Doctorale 306 –SPSA, Montpellier. 378p.

(12) Yezza S., et Bouchama S., 2014: index des métabolites secondaires végétaux, université kasdi merbah, Ouargla faculté des sciences de la nature et de la vie département des sciences biologiques.47 pages.

(13) Bouakaz I., 2006 : Etude phytochimique de la plante Genista Microcephala. Mémoire de magister, Batna.

(14) Havsteen B.H., 2002 : The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Therapeut. p96, 67–202.

(15) Erlund., 2004:Nut.Res. p24, 851-74.

(16) Dacosta Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317p. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

(17) Deina, M., Rosa, A., Casu, V., Cottiglia, F., Bonsignore, L. (2003). Natural product:theirchemistry and biologicalsignificance, Journal of the American OilChemistry Society. 80:65-70.

(18) Hoffman, L. (2003). Etude du métabolisme des phénylpropanoides, Thèse de doctorat. Strasbourg. 245p.

(19) Djemoui, D. (2012). Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de quelques coumarines synthétisées, Mémoire Master Académique. 53p.

(20) BRUNETON J., 2009. Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales, 4éme édition de médicales internationales (Tec et Doc), Paris: 1288.

(21) Ghestem A., Seguine., Parism., Orecchionia M., 2001 : Le préparateur en Pharmacie. 2èmeed. Ed. Tec et Doc, Paris. France. 275p.

(22) Khanbabae K., Ree T.R., 2001 : Tannins: Classification and Définition. Journal of Royal Society of Chemistry. Vol. (18): 641-649.

(23) Rira M., 2006 : Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Thèse de Magister en biochimie et microbiologie appliquées, Université Mentouri Constantine, Algérie. 94 p.

(24) Badiaga M., 2011 : Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea Latifolia Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.10 p.

(25) Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p.

(26) Mauro, N. M. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxinea et la (±)-camptothécine, thèse doctorat. p13, 16-28.

(27) Ayad, R. (2008). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce zygophyllum cornutum, Mémoire magister En Chimie Organique. p 35-39, 40, 47.

(28) Malecky, M. (2005). Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. p 9, 13-19, 20, 27.

(29) Benaissa, O. (2011). Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres Chrysanthemumet Rhantherium, Thèse Doctorat. 63p.

(30) Djeddi S., 2012 –Les huile essentielles «Des mystérieux métabolites secondaires»:Manuel de formation destiné aux étudiants de Mastre. ED.Presses Académiques Francophones Grece, 64p.

(31) Delille L., 2013 –Les plantes médicinales d'Algérie. Ed. BERTI, Alger,122 p.

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

(33) Brunton J**.** Pharmacognosie photochimie plantes médicinales 3ème édition. Paris.

(34) Couic-Marinier F et Lobstein A. (2013). Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. Actualitéspharmaceutiques. N° 525. 3 p.

(35) Bakkali. F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – A review ; Food and Chemical Toxicology 46 (2008) 446–475 Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbesaromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat.

(36) Lardry JM et Haberkorn V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. Kinesither Rev; volume. 61, 14-7.

(37) Festy D. (2011). Les huiles essentielles ça marche. A propos de l'aromathérapie. Editions: Leduc.s .Paris. 9 p.

(38) Dorosso Sonate J. Composition chimique des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : valorisation. Université Ouagadougou.2002.

(39) Kaloustian J, Hadji-Minaglo F. La connaissance des huiles essentielles : qualitologie et aromathérapie. Paris. Edition Springer. 2012.

(40) Leon R. O., (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » d'origine végétale, Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.

(41) Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E.M., Garrido, J., and Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. BioMed Res. Int. 2013, 251754.

(42) Lakhdar L., (2015). *Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur Aggregatibacter Actinomycetemcomitans : Etude in vitro*. Thèse de doctorat,Sciences Odontologiques, Université Mohammed V de Rabat, 6 ; 38-45p.

(43) Da Silva F., (2010). *Utilisation des huiles essentielles en infectiologie orl*. Thèse de Doctorat, Pharmacie, UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1, 6 ; 26 ; 29 ; 45p.

(44) Raymond M., (2005).L'aromathérapie chez le nourrisson et le petit enfant. Thèse de Doctorat, Pharmacie, Université de Nantes, 25 ; 27 ; 34 ; 42 ; 62 ; 67p.

(45) Benbouali M., (2006).Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de "Mentha rotundifolia et Thymus vulgaris".Magister, Génie chimique, Université Hassiba BEN BOUALI –CHLEF, 6-10 ; 17 ; 20-24 ; 29-37 ; 68-73p.

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

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

(48) Couderc V.L. (2001). Toxicité des huiles essentielles. Thèse de doctorat pour l'obtention du grade de docteur vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire Toulouse. p 84.

(49) Kurkin, V. (2003) Phenylpropanoids from medical plants: distribution classification, structural analysis, and biological activity, chemistry of natural compounds,39,123-153.

(50) Khenaka K. 2011. Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin, Diplôme de Magister En Microbiologie Appliquée, Université Mentouri Constantine.

(51) évidence box. Les huiles essentielles dans les cosmétiques [en ligne]. [Consulté le 27janvier 2018]. Disponible sur http:box-evidence.com.

(52) Touré D., (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de doctorat, Biochimie, Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY, 5-15 ; 41 ; 49 ; 81p.

(53) Ouis N. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil [these]. Universite d'Oran, 2015**.**

(54) Korner, C. (2007). The use of 'altitude' in ecological research. Trends Ecol. Evol, 22: 11.

(55) Reisch, C., Anke, A., and Rohl, M. (2005). Molecular variation within and between ten provenances of Primula farinosa (Primulaceae) along an altitudinal gradient in the northern Alps. Basic Appl. Ecol, 6: 35–45.

(56) Capuzzo A., Maffei M.E., Occhipinti A. 2013. Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances**.** Molecules.18:7194-7238.

(57) Marie E., 2005. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles : p 17 ; 23,52.

(58) Silou T., Malanda M., Loubaki L., 2004 : Optimisation de l'extraction d'huile essentielle de cymbopogoncitratusgrace à un plan factoriel complet 23.Journal of food engineering.

(59) Fekih N. Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre Pinus poussant en Algérie [thèse].Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid. 2015**.**

(60) Tongnuanchan, P .and Benjakul, S. J .Food Sci. 2014, 79(7), R1231.

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

(62) Roldan-Gutiérres J.M., Ruiz-Jiménez J., Luque de Castro M.D., 2008 :Ultrasoundassisted dynamic extraction of valuable compouds from aromatic plants and flowrs as compared with steam distillation and superheated liquid extraction. Talanta

(63) Halal Y ., 2010 –etude et biomasse du Romarin (Romarins officinales L.) dans le massif des béni-Imloul-Aures-Algerie, université de la foresterie, p.71.

(64) Franchomme et Phénoél ., 1990 – Aromatherapy for health professionals Hormonal essential oil A few essential oils which are hormonal but not neurotoxic.journal of essential oil research .vol 13: 102-112.

(65) Jammaleddine M. Extraction et caractérisation de la composition des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus* du Moyen Atlas [Mémoire]. Université sidi mohammed ben abdellah. Fès, 2010.

(66) Chabrier J-Y. Plantes Medicinales et Formes d'utilisation en phytotherapie. [These] Université Henri Poincare-Nancy. 2010**.**

(67) Lucchesi, M. E. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline ;Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies. 2005.

(68) Hernandez Ochoa, L. R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine (solvant/actif) d'origine végétale. Thèse de Doctorat en Science des Procédés (option Sciences des Agroressources), Institut National Polytechnique, Toulouse, France.

(69) LUCCHESI M. E., CHEMAT F. et SMADJA J., 2004a : Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. J. Chromato A, , Vol. 1043, pp : 323-327.

(70) Beneteaud, E, < les techniques d'extractions >, comité français de parfum 2011.

(71) Salomé-abarca, L.F. ; Soto-Hernandez, R.M. ; Cruz-Huerta, N and Gonzalez-Hernandez, V. A.bot.Sci. 2015, 9(3), 633-638.

(72) Iserin P. Encyclopédie des plantes médicinales 2ème édition. Paris: Larousse. Edition 2001.

(73) CHEMAT S., LAGHA A., AIT AMAR H., BARTELS P.V. et CHEMAT F., 2004a : Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. Flavour and Fragrance Journal, Vol. 19, pp : 188 – 195.

(74) Pourmortazavi S.M. and Hajimirsadeghi S.S. 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. Journal of Chromatography A. 1163:2-24.

(75) Grunwald J, Janicke C. Guide de la PHYTOTHERAPIE. 2èmeedition. Edition MARABOUT. Italie : 2006) ; (Homéopathie-Définition, avantage et controverse. [En ligne].2018 ; consulté le 28 février 2018.disponible sur : www.santémedecine.journaldesfemmes.fr.

(76) Kumar S. and Pandey A.K. 2013. Chemistry and biological activities of Flavonoids: An overview. The Scientific World Journal.1-16.

(77) Hellali N., Mahammed M.H., Ramdane F., Talli A. 2016. Antimicrobial and antioxidant activities of Cybopogon schoenanthus (L.) spreng essential oil, growing in Illizi – Algeria. Journal of medicinal plant research.10:188-194.

(78) Raut J. S. and Karuppayil S. M. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. Industrial Crops and Products. 62:250-264.

(79) Lewis K., Ausubel F.M. 2006. Prospects for plant derived antibacterials. National Biotechnology. 24:1504-1507.

(80) Activité antifongique [en ligne].consulté en Février 2018. Disponible sur www.infectiologie.com).

(81) Mayer F. utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Etude de cas en maison de retraite. [Thèse] Université de Lorraine, 2012.

(82) Sylvie Verbois., 2001. Huiles Essentielles et Parfums qui Guérissent et qui Relaxent, La Voie De l'Ayurveda, Ed. Trajectoire.

(83) PURCHON, N.,La bible de l'aromathérapieEdition Marabout, 2001.

(84) WILLEM, J.P.Le guide des huiles essentielles pour vaincre vos problèmes de santéEditions LMV, 2002.

(85) De Billerbeck V.G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques – Phytothérapie ; Vol. 5 ; pp 249–253.

(86) Franchrome P , Jollois R, Penoel D. L'aromatherapie exactement : encyclopédie de l'utilisation des extraits aromatiques. Paris : Edition Roger Jollois. 2001**.**

(87) Velé H. Valorisation officinale des huiles essentielles autorisées dans les phytomédicaments [thèse]. Université Angers, 2015**.**

(88) Edris, A.E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. Phytother. Res. 21, 308-323.

(89) Aburjai, T.; Natsheh, F.M. Plants used in cosmetics. Phytother. Res. 2003, 17, 987–1000.

(90) Chavassieux D. Les huiles essentielles en protection des cultures ? Analyse et Enquêtes. Institut Technique de l'Agriculture Biologique (ITAB). 2014.

(91) Small E., Deutsch G., (2001). Herbes culinaires pour nos jardins de pays froid. NRC ResearchPress, 193p.

(92) Biotechnologie végétale. Les huiles essentielles[en ligne]. 2012 [consulté en Janvier 2018].Disponible sur http : mira biotéchnologievégétale.blogspot.com.

(93) Courtial S. precis d'aromatherapie veterinaire a l'usage des pharmaciens d'officine [these]. Université de Nante, faculté de pharmacie. 2005.

(94) Chabert G. myrtacées et aromathérapie [thèse]. Faculté de pharmacie de Grenoble, Université Joseph Fourier, 2013.

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

(96) Amiot J. (2005)*Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l´écologie évolutive des composés secondaire. Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d´Agronomie de Montpellier.

(93) Couplan F. (2012). Les plantes et leurs noms. Histoire insolite, Editions Quae, p. 224.

(94) Couplan F, 2000, Dictionnaire d'étymologie de botanique : Comprendre facilement tous les noms scientifiques. Edition Lausanne : Delachaux et Nestlé, Paris, 238p

(95) Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P, 2002, Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. De Boeck université, Paris-Bruxelles, 467p

(96) Harley R.M., Atkins S., Budantsev A., Cantino P.H., Conn B., Grayer R., Harley M.M., Kok R., Krestovskaja T., Morales A., Paton A.J., Ryding O., Upson T, ,labiatae. In: Kadereit, J.W. 2004, The families and genera of vascular plants (Kubitzki, K: ed). Volume 7, p 167-275

(97) Rey C., (1990). La culture du thym en Suisse. *Revue horticole suisse*, 63 : 20-22.

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

(99) Cowan M.M., (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbioloy reviews, 12(4): 564-570.

(100) Bazylko A. et Strzelecka H. (2007). Fitotherapia., 78 : 391-395

(101) Özcan M., J.-C. Chalchat (2004) Aroma profile of Thymus vulgaris L. Growing Wild in Turkey. Bulg. J. Plant Physiol. 30 (4) : 68-73.

(102) Zeghib A. Étude phytochimique et activité antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale d'extraits et d'huile essentielle de quatre especes endemiques du genre Thymus. [Thèse]. Constantine : Université Constantine 1, 2013.

(103) Cheurfa M., (2015). Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé. Thèse dedoctorat LMD, sciences alimentaires et nutrition, Université Hassiba BEN BOUALI – Chlef, 4-7 ; 12 ; 19 ; 27-41p.

(104) Goetz P, Guedira K. Phytothérapie anti-infectieuse. Paris: Springer, 2012.

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

(106) Lambinon J. et al., Nouvelle flore de la Belgique, du G.-D. de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines (Ptéridophytes et Spermatophytes), Meise, Jardin botanique national de Belgique, 6e éd., 2012, 1195 p.

(107) Wichtl M, Anton R. PLANTES THERAPEUTIQUES : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2ème édition. Edition TEC et DOC. 2003.

(108) Grunwald J, Janicke C. Guide de la PHYTOTHERAPIE. 2èmeedition. Edition MARABOUT. Italie : 2006.

(109) Arvy MP,Gallouin F. Épices, aromates et condiments. Édition Clerc- Saint- Aman Montrond. N d'edition : 003063-02.2007. France.

(110) Tamert A., Latreche A.,Aouad L., (2017). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Extracts of *Thymus serpyllum* and *Thymus vulgaris* from the Mount of Tessala (Western Algeria).*Pharmacognosie*, 15: 384-394.

(111) Madi A., (2010).Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques.

Magister, Biotechnologie végétale, Université Mentouri Constantine, 5 ; 17 ; 51 ; 55p.

(112) Hahn, M. W., H. Lunsdorf, Q. Wu, M. Schauer, M. G. Hofle, J. Boenigk, and P. Stadtler. 2003. *Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia*. Appl. Environ. Microbiol. 69:1442-1451.

(113) Becker N.S.C., D.M. Bennet, B.A. Bolto, D.R. Dixon, R.J. Eldridge, N.P. Le et C.S. Rye (2004). Detection of polyelectrolytes at trace levels in water by fluorescent tagging. React. Funct. Polym., 60, 183-193.

(114) Murray, P. R.,; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Landry, M. L.; Pfaller, M. A.; Yolken, R.H. Manual of Clinical Microbiology (8th ed.). Herdon VA, United States of America :American Society for Microbiology. 2003.

(115) Le Loir, Y.; Baron, F., Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*. 2003, 2, 63-76.

(116) SpendloSpendlove, J. C.; Fannin, K. F. Source, significance, and control of indoor microbial aerosols : human health aspects. *Public Health Reports*. 1983, 98, 3, 229.

(117) Schaechter, M., Medoff, G., & Eisentsein, B, I, (1999). Microbiologie et pathologie infectieuse. De Boeck Superieur,81,181.

(118) Fauchère, J. L.; Avril, J. L. Bactériologie générale et médicale. Ed., Ellipse.2002, p, 213-281.

(119) Prescott, L.; Harley, J.; Klein, D. Microbiologie 3ème Ed., De Boeck. 2010. P, 520-582.

(120) Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. Introduction à la microbiologie 2ème édition,Ed., ERPI Science. 2012. p , 141-145.

(121) Farmer lii,J., Boatwright,K.& Janda,J.(2007) Enterobacteriaceae: introduction and identification, p 649-669, *Manual of clinical microbiology,9th ed.ASM Press,Washington,DC.*

(122) Donnenberg,M.& Kaper,J.(1992)Enteropathogenic Escherichia coli,Infection and immunity,60,3953.

(123) Yakhlef G., (2010). *Etude de l'activite biologique des extraits de feuilles de Thymus vulgarisl. et Laurus nobilis l.* Magister, Biochimie Appliquée, UNIVERSITE EL HADJLAKHDAR –BATNA, 10 ; 43-44p.

(124) Medjekane M., (2017).*Prévalence de l'infection à Helicobacter pylori et son inhibition par des molécules bioactives.* Thèse de Doctorat, Nutrition humaine, Université HassibaBenbouali de Chlef.

(125) Abdelli W., (2017). Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea et de Thymus vulgaris.* Thèse de doctorat3ième cycle LMD, Microbiologie Appliquée, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 1-2 ; 15-16 ; 31-35 ; 70-72 ; 80 ; 90 ; 104p.

(126) El Abed D., Kambouche N., (2003). *Les huiles essentielles*; Ed. Dar El Gharb ; Oran.

(127) NF T 75 112,1977**.**

(128) Melet I., Benchabane N., (1997). *Contribution à l'extraction et l'étude de l'huile essentielle d'eucalyptus.* Thèse d'ingénieur d'état; Univ. Médéa.

(129) NF T 75 103,1982.

(130) Fesneau M., De Larochepiquet P. (2005). Les huiles essentielles d'A-Z. Lanature au service de la vie, les essences végétales naturelles.

(131) NF T 75 104, 1982.

(132) AFNOR NF T 75-006**.**Association Française de normalisation Paris, pp 559-563.

(133) AFNOR,1994.

(134) Bachiri, L., Echchegadda, G., Ibijbijen, J., Nassiri, L., 2016. Etude Phytochimique Et Activité Antibactérienne De Deux Espèces De Lavande Autochtones Au Maroc:«Lavandula stoechas L. et Lavandula dentata L.». European Scientific Journal, ESJ 12.

(135) Cheurfa M., (2015). *Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé*. Thèse de doctorat LMD, sciences alimentaires et nutrition, Université Hassiba BEN BOUALI – Chlef, 4-7 ; 12 ; 19 ; 27-41p.

(136) Bouguerra N., Djebbar F.T., Soltani N., (2017). Algerian Thymus vulgaris essential oil: Chemical composition and larvicidal activity against the mosquito Culex pipiens. International Journal of Mosquito Research, **4**(1): 37-42.

(137) Rajeswara Rao B.R., Bhattachrya A.K., Kaul P.N., Chand S., Ramesh S.,(1993).Changing in profiles of essential oil rose sented germanium (*Pelargonium sp*) duringleaf ontogeny. *Journal of Essential oil Research*. **5**: 301-304.

(138) Lazouni, H.A., Benmansour A., Taleb-Bendiab S.A., ChabaneSari D., (2007**).** Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du*Foeniculum vulgare* Mill. *Sciences & Technologie*, **25**: 7-12.

(139) TEUSCHER, ANTON R, LOBSTEIN A., 2005 - Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris, Lavoisier, 522p.

(140) M. CHENINI, <<Etude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuille du basilic (*ocimim basilicum L.)* l'extrait par hydro distillation et par micro-ondes >>**,** Thèse de doctorat en chimie moléculaire, université d'Oran 1 Ahmed Benbelle 2016.

Annexes

Test de la catalase

Principe

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation de peroxyde d'hydrogène. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée (H2O2) en eau (H2O) et oxygène (O2).

Technique

La technique consiste à déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame. A l'aide d'une pipette pasteur stérile prélever quelques colonies de la souche à tester et les déposer dans la goutte d'eau oxygénée.

Résultat

L'apparition de nombreuses bulles indique une réaction positive

Test TSI

Principe

Le milieu Triple-Sugar-Iron est un milieu d'identification rapide pour les entérobactéries, permet de mettre en évidence la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement gazeux), du lactose, du saccharose et la production de H2S.

Technique

Prélèvement d'une colonie caractéristique à partir d'une culture fraîche sur milieu Baird Parker, puis suspendue dans de l'eau physiologique, et grâce à une pipette Pasteur une goutte de cette dernière et ensemencée par une piqûre centrale au niveau du culot et par des stries à la surface tout au long de la pente. Au terme d'une incubation pendant 24 h à 37°C,

Résultats

La fermentation du glucose se traduit par le virage au jaune du culot, et la production de gazse traduit par la formation de bulles de gaz dans la gélose ou le décollement de celle-ci.

La fermentation du lactose et/ou du saccharose se traduit par le virage au jaune de la pente.

Production de H_2S se traduit par noircissement du milieu.

Utilisation de mannitol et test de mobilité

Principe

Le mannitol-mobilité est un milieu semi solide qui permet l'étude de la dégradation du mannitol, et la mobilité. Ce milieu est utilisé seulement pour les bactéries fermentatives.

Mode d'ensemencement

Ensemencement par piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur, incubation à 37C° pendant 24 h.

Résultat

Le virage du milieu rouge au jaune signifie la fermentation du mannitol.

L'observation d'une culture dans tout le tube signifie que les bactéries ont diffusé dans tout le milieu (mobilité +).

Lorsqu'il y a culture uniquement au niveau de la piqure centrale (mobilité-).

Recherche de l'utilisation de citrate

Principe

Le milieu citrate de sodium (simmons) est un milieu solide qui permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie, ce caractère est intéressant pour discriminer les bactéries entre-elles ainsi de les identifier.

Mode d'ensemencement

Prélèvement à partir du milieu Baird Parker d'une colonie caractéristique qui est suspendue dans de l'eau physiologique, à l'aide d'une anse de platine une goutte de la suspension est ensemencée en strie sur toute la surface de la pente, au terme d'incubation de 7 jours à 37°C

Résultats

L'utilisation du citrate de sodium se traduit par un virage de couleur du vert au bleu qui signifie qu'il y a eu une alcalinisation du milieu et que la bactérie possède un citrate perméase (citrate+)

La composition des milieux de culture

- **Gélose nutritive**

Extrait de viande……...……....01g

Extrait de levure ……..….02g

Peptone……..…….....05g

Chlorure de soduim ……..05g

Agar……...……..15g

pH = 7,4

- **Gélose Hektoen**

Protéose-peptone..... 12g

Extrait de levure ……...03g

Lactose……..……...12g

Saccharose……...…….....12g

Salicine……..……..…….02g

Citrate de fer III et d'ammonium……...……1.2g

Sels biliaires……..…….……..09g

Fuchsine acide…… ….....0.1g

Bleu de bromothymol……..…….0.065g

Chlorure de sodium……..……..05g

Thiosulfate de sodium……...05g

Agar …….....14g

pH = 7,5

- **Gélose Mueller-Hinton**

Infusion de la viande de boeuf…….300ml

Peptone de caséine……..……..….17,5g

Amidon de mais……..……..1.5g

Agar ……..…….....…17g