



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun –Tiaret  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

**MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DE DIPLOME**

**MASTER**

**Spécialité : Biotechnologie Microbienne**

*Présenté par :*

**BOUDIFA NADJET**

**OUMRANI FATIMA ZAHRA**

Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii*.

*Devant le Jury :*

**Présidente :** M<sup>me</sup> BOUBAKEUR B.

**Encadrante :** M<sup>me</sup> MEZOUAR Dj.

**Co-encadrante :** M<sup>me</sup> SMAIL L.

**Examinatrice :** M<sup>me</sup> NEHILA A.

*Grade :*

MCA

MCA

Ingénieur de labo

MCB

**Année Universitaire : 2022/2023**

## Remerciements

*Nous tenons à remercier Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour achever ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent d'abord, à notre promotrice, Dr. MEZOUAR Djamilia, la qualité de son enseignement, ses conseils et son intérêt et pour sa précieuse aide à la relecture et à la correction de notre mémoire et un spécial remerciement à notre Co-encadrant et ingénieure de laboratoire de microbiologie Mme SMAIL Leila pour ses conseils qui nous ont donné confiance et sécurité.*

*Nous adressons nos vifs remerciements aux membres de jury, présidente Dr. BOUBAKEUR Bet examinatrice Dr. NEFLAA qui ont bien accepté de participer à l'évaluation de notre travail.*

*Nous remercions tous les techniciens du laboratoire Ibn Khaldoun Tairat,*

*Nos remerciements vont également à toute la promotion de M<sup>2</sup> Biotechnologie microbienne.*



## *Dédicace*

*À l'aide de dieu le tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,  
j'ai pu réaliser ce travail que je dédie ;*

*À la lumière de ma vie, mon soutien et source de joie et de bonheur mon  
père **Miloud** et pour leur courage et sacrifice et sa présence dans ma  
vie.*

*À ma chère maman **Malika** qui m'encourage d'aller toujours vers  
l'avant et qui m'a donné confiance.*

*À mes chères sœurs et leurs enfants **Khaira, Amel, Zohour,  
Rahmouna, Fatima.***

*À mon petit frère, la poule de mon cœur **Benoumer.***

*Un spécial dédicace à mon beau-frère **Bachir** pour son soutien et ses  
conseils.*

*À ma belle-famille, mes proches et ceux qui me donnent de l'amour et de  
la vivacité.*

*À tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus  
de succès.*

*Nadjet*

## DEDICACE

*Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond  
amour :*

*À celle qui m'arrosé de tendresse et d'espoirs, à la source  
d'Amour Incessible à la mère des sentiments fragiles qui ma  
bénie par ces prière . . . . . Maman*

*À mon support dans ma vie, qui m'a supporté et ma dirigé  
vers la gloire . . . . . Papa*

*À mes chers frères Abdelkader, Mohamed, Brahim,  
Anes.*

*À ma chère copine et ma moitié Bassma*

*Fatima*

## Résumé

Notre étude a tracé comme objectif l'extraction des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii* et la détermination de leurs caractéristiques physicochimiques ainsi que l'évaluation de leurs activités antibactériennes sur quatre souches bactériennes *Staphylococcus aureus* (Gram+), *Escherichia coli* (Gram-), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram+), et *Bacillus cereus* (Gram+).

L'extraction des huiles est réalisée par la méthode d'hydrodistillation sur deux plantes provenant de différentes régions ; *Thymus vulgaris* acheté de la commune d'AinHdid dans la wilaya de Tiaret et *Thymus fontanesii* de la commune de Bordj Bounaama dans la wilaya de Tissemsilt.

Les résultats montrent que le rendement en huile essentielle de *Thymus vulgaris* est d'environ 1,062% et l'huile possède une couleur jaune claire à un aspect liquide avec une odeur épicée. En revanche, le rendement en huile essentielle de *Thymus fontanesii* est équivalent à 1,065 % avec une couleur jaune foncée et un aspect liquide et une odeur odorante.

D'autre part, les valeurs de l'indice physique pH de *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii* sont respectivement 5,88 vs 5,60. En ce qui concerne les indices chimiques, nous avons trouvé que l'indice d'acide est de 0,25 pour *Thymus vulgaris* et 0,39 pour *Thymus fontanesii*, ainsi que les indices de saponification est de 280,55 pour *Thymus vulgaris* et 392,11 pour *Thymus fontanesii* et d'ester sont de 280,3 pour *Thymus vulgaris* et 391,72 pour *Thymus fontanesii*.

L'activité antibactérienne est réalisée par deux méthodes de diffusion des disques sur un milieu gélosé (MH) et par microdilution sur un milieu liquide, les résultats montrent que les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et de *Thymus fontanesii* exercent une inhibition vis-à-vis des quatre souches testées avec un diamètre qui varie entre 49mm et 57 mm pour *Thymus vulgaris* et la meilleure activité est observée sur *Staphylococcus aureus* (Gram+) et *Bacillus cereus* (Gram+) avec un diamètre de 57mm. Pour *Thymus fontanesii* la meilleure activité est exercée sur *Bacillus cereus* (Gram+) avec un diamètre de 55mm.

Les résultats des CMB et CMI montrent que les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii* ont une activité antibactérienne intéressante vis-à-vis des souches bactériennes testées.

**Mot clé :** *Thymus vulgaris*, *Thymus fontanesii*, huile essentielle, caractéristiques physicochimique, activité antibactérienne, concentration minimale inhibitrice (CMI), concentration minimale bactéricide (CMB).

## ملخص

تتبعت دراستنا استخلاص الزيوت الأساسية لنوعين من نبات الزعتر وكذا دراسة العوامل الفيزيائية و الكيميائية وتقييم النشاط المضاد للبكتيري على أربع سلالات من البكتيريا: الاشريكية القولونية (جرام-) العنقودية الذهبية (جرام+) العصوية الشمعية (جرام+) و الزائفة الزنجارية(جرام-).

تم استخلاص هذه الزيوت بطريقة التقطير المائي لنوعين من نبات الزعتر من مناطق مختلفة الأول من منطقة عين حديد ولاية تيارت والثاني من منطقة برج بونعامه ولاية تسمسيلت.

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن مردود استخلاص الزيت الأساسي للزعتر الأول 1.062 % مع لون اصفر فاتح- مظهر سائل مع رائحة حارة. من ناحية أخرى فان محصول الزيت العطري الثاني يعادل 1.065 % مع لون اصفر غامق مظهر سائل و رائحة عطرة.

من ناحية أخرى, فان قيم مؤشر الأس الهيدروجيني لكل من الزيت الأساسي الأول و الثاني هي على التوالي 5.88 و 5.60, فيما يتعلق بالمؤشرات الكيميائية فان المؤشر الحمضي للزيتين الأول و الثاني 0.25 و 0.39 على التوالي . مؤشرات التصبن لزيت الأساسي للزعتر الأول هي 280.55 و أما بالنسبة للزيت الأساسي للزعتر الثاني 391.72 و مؤشر الأستر 280.3 و 391.72 على التوالي .

تمتقييم النشاط المضاد للبكتيريا من خلال طريقتين الأولى من خلال نشر الأقراص على وسط أجار والثانية عن طريق التخفيف الدقيق على وسط سائل . تظهر النتائج أن الزيوت الأساسية للنباتين تمارس تثبيطا ضد السلالات الأربعة المختبرة يتراوح قطرها بين 49 ملم و 57 ملم بالنسبة للزيت الأول . و يلاحظ أفضل نشاط على بكتيريا العصوية الشمعية (جرام+) بالنسبة لزيت النبات الثاني وقطرها 57ملم.

اظهرت نتائج الحد الأدنى للتركيز و الحد الأدنى من تركيز البكتيريا لكلا من النباتين نشاط مضاد للبكتيريا مهم ضد السلالات الأربعة المختبرة.

**الكلمات المفتاحية :** الزعتر- الزيت الأساسي-التقطير المائي-النشاط المضاد للبكتيريا-الخصائص الفيزيوكيميائية- الحد الأدنى للتركيز - الحد الأدنى من تركيز البكتيريا.

## **Abstract**

Our study traced as objective of the essential oils of *Thymus vulgaris* and *Thymus fontanesii* the extraction and the determination of physicochemical characteristics as well as the evaluation of their antibacterial activities on four bacterial strains *Staphylococcus aureus* (Gram+), *Escherichia coli* (Gram-), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram+), and *Bacillus cereus* (Gram+).

The extraction of the oils is carried out by the method of hydrodistillation on two plants from; different regions; *Thymus vulgaris* from the commune of Ain Hdid in the wilaya of Tiaret and *Thymus fontanesii* from the commune of Bordj Bounaama in the wilaya of Tissemsilt.

The result show that the essential oil yield of *Thymus vulgaris* is about 1,062 % and the oil has a light yellow colour to liquid appearance with a spicy smell. On the other hand, the essential oil yield of *Thymus fontanesii* is equivalent to 1,065% with a dark yellow colour and a liquid appearance and a fragrant odor.

The values of the pH physical index of *Thymus vulgaris* and *Thymus fontanesii* are respectively 5,88 vs 5,60, regarding the chemical indices, we found that the acid index is 0,25 for *Thymus vulgaris* and 0,39 for *Thymus fontanesii*, thus the saponification indices are 280,55 for *Thymus vulgaris* and 391,72 for *Thymus fontanesii*,

The antibacterial activity is carried out by two methods of diffusion of the discs on agar medium (MH) and by microdilution on a liquid medium, the result show that the essential oils of *Thymus vulgaris* and *Thymus fontanesii* exert an inhibition against the four strains tested with a diameter varies between 49mm and 57mm for *Thymus vulgaris* and the best activity is observed on *Staphylococcus aureus* (Gram+) and *Bacillus cereus* (Gram+) with a diameter 57mm, for *Thymus fontanesii* the best activity is exerted on *Bacillus cereus* with a diameter 55mm,

The result of the *CMB* and *CMI* show that the essential oils of *Thymus vulgaris* and *Thymus fontanesii* have an interesting antibacterial activity against the bacterial tested.

## **Key words**

*Thymus vulgaris*, *Thymus fontanesii*, essential oil, hydrodistillation, antibacterial activity, physico-chemical characteristics, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC).

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 01</b>	Classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i> .....	09
<b>Tableau 02</b>	Cassification botanique de <i>Thymus fontanesii</i> .....	09
<b>Tableau 03</b>	Conditions opératoires de l'hydrodistillation des deux plantes médicinales.....	10
<b>Tableau 04</b>	Rendement en huile essentiel de <i>Thymus vulgaris</i> et <i>fontanesii</i> .....	25
<b>Tableau 05</b>	caractéristiques organoleptiques des HEs de <i>Thymus vulgaris</i> et <i>Thymus fontanesii</i> .....	27
<b>Tableau 06</b>	Résultat des caractéristiques physicochimique des HEs.....	27
<b>Tableau 07</b>	Résultat de l'identification des souches.....	29
<b>Tableau 08</b>	Zones d'inhibitions (mm) des souches bactériennes.....	31
<b>Tableau 09</b>	CMI Cet CMB des deux huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> et <i>Thymus fontanesii</i> .....	35

## Listes des figures

<b>Figure 01</b>	Localisation de la commune d'Ain Hdid dans la wilaya de Tiaret.....	09
<b>Figure 02</b>	Localisation de la commune de Bordj Bounaama.....	09
<b>Figure 03</b>	Dispositif d'hydrodistillation.....	10
<b>Figure 04</b>	Huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> .....	12
<b>Figure 05</b>	Huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> .....	12
<b>Figure 06</b>	Bandelette de pH .....	13
<b>Figure 07</b>	pH mètre.....	14
<b>Figure 08</b>	Détermination de l'indice de saponification d'HE de <i>Thymus vulgaris</i> .....	16
<b>Figure 09</b>	Détermination de l'indice de saponification d'HE de <i>Thymus fontanesii</i> .....	17
<b>Figure 10</b>	milieux de culture utilisés .....	18
<b>Figure 11</b>	Test d'ONPG des souches bactériennes.....	20
<b>Figure 12</b>	Préparation du milieu de Müller Hinton.....	21
<b>Figure 13</b>	Observation microscopique des quatre souches bactériennes (coloration de Gram).....	30
<b>Figure 14</b>	les zones d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> .....	33
<b>Figure 15</b>	les zones d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> .....	34

## Liste des Abréviations

**AFNOR** Association française de normalisation

**AGL** Acide gras libre

**CMB** concentration minimale bactéricide

**CMI** concentration minimale inhibitrice

**HEs** Huiles essentielles

**IA** Indice d'acide

**IE** Indice d'ester

**Is** Indice de saponification

**MH** Muller Hinton

**ONPG** L'o-Nitrophényl-B-D-galactopyranoside

**pH** Potentiel hydrogène

**RHE** Rendement des huiles essentielles

*T.fontanesii* *Thymus Fontanesii*

*T.vulgaris* *Thymus vulgaris*

**TTC** chlorure Triphényl-2,3,5-tétrazolium

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	
<b>Dédicace</b> .....	
<b>Résumés</b> .....	
<b>Liste des Tableaux</b> .....	
<b>Liste des Figures</b> .....	
<b>Liste des abréviations</b> .....	
<b>I. Introduction</b>	
Introduction .....	02
<b>II. Matériel et méthodes</b>	
II.1. Matériel végétale.....	07
II.1.1. Lieu et période de récolte .....	07
II.1.2. Classification des deux plantes.....	08
II.2. Protocole expérimentale.....	09
II.2.1. Sèchage et préparation de la plante.....	09
II.2.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation .....	09
II.2.3. Conservation des huiles essentielles.....	11
II.2.4. Détermination de rendement.....	12
II.3. Détermination des propriétés physicochimiques d'HE.....	13
II-3-1 Indice physique .....	13
II.3.2. Indices chimiques.....	14
II-4 Activité antibactérienne.....	17
II.4.1 Souches bactériennes .....	17
II.4.2 Repiquage .....	18
II.4.3 Tests de confirmation.....	18

II.4.4 Méthode de diffusion sur un milieu gélosé :(Aromatogramme).....	20
II.4.5 Méthode de diffusion sur un milieu liquide :(microdilution).....	22
<b>III .Résultats et discussion</b>	
III-1Rendement des huiles essentielles.....	25
III-2 Caractéristiques organoleptiques .....	26
III -3 Caractéristiques physicochimiques d’HEs.....	26
III.4 Evaluation de l’activité antibactérienne des huiles essentielles .....	29
III.4.1 Tests de confirmation des souches.....	29
III.4.2 Test de sensibilité.....	31
III.4.3Détermination des concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales bactéricides des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> et <i>Thymus fontanesii</i> .....	35
<b>Conclusion</b> .....	39
<b>Références bibliographiques</b> .....	42
<b>Annexes</b> .....	49

# **INTRODUCTION**

## **I- Introduction**

Les plantes occupent une partie essentielle de la vie de tous les jours de l'homme. Elles servent pour la nutrition, le soin et dans d'autres cas l'accomplissement des rites religieux. L'utilisation des extraits des plantes est très ancienne, elle remonte aux Égyptiens, Romains et Grecs (**Fellah, 2006**).

La science qui étudie les plantes est nommée la phytothérapie et qui correspond à l'utilisation des plantes dans le but de traiter ou prévenir les maladies. Cette discipline utilise les feuilles, les fleurs et les sommités fleuries, les racines ou les plantes entières, comme elle peut utiliser des plantes spontanées ou cultivées (**Létard et al., 2015**).

La médecine traditionnelle est devenue le moyen de traitement le plus utilisé par environ 65- 80% de la population mondiale. Ce recours vers le traitement par le biais de plantes est le résultat de la propagation de la pauvreté et le manque d'accès à la médecine moderne (**Badiaga, 2011;M'hamedMerdji et al., 2023**).

En Algérie, et au travers des siècles, les traditions ont su développer, conserver et transmettre la connaissance ainsi que l'utilisation des plantes médicinales pour des besoins domestiques. Dès lors, les plantes médicinales constituent une opportunité réelle à renforcer en matière de développement et d'organisation de filière en Algérie et ce, notamment dans les régions rurales et montagneuses. Cette alternative constituerait un plus à la fois en matière de ressources possibles mais également pour maintenir une tradition rurale et réduire partiellement l'exode vers les villes (**M'hamedMerdji et al., 2023**).

Les huiles essentielles (HEs) sont des substances odorantes volatiles produites par certaines plantes. On les trouve principalement au niveau des fleurs, des bourgeons, des feuilles, des rameaux, de l'écorce, du bois, des racines, des rhizomes, des bulbes, des fruits, des pelures, des graines et de la résine des plantes (**González et al., 2011;Sadgrove et Jones, 2015**). Les HEs contribuent à la survie de l'organisme concerné. En fait, le terme "huiles essentielles" a été inventé par un pionnier suisse de la médecine, au début du XVIe siècle, en référence aux composants efficaces d'un médicament appelé Quintaessentia (**Sadgrove et Jones, 2015**).

L'HE est un mélange complexe de plusieurs substances volatiles, principalement des sesquiterpènes, des monoterpènes, des aldéhydes, des alcools, des esters et des cétones. Elle joue un rôle primordiale dans la résistance des plantes contre les ravageurs, les herbivores, les

champignons et les bactéries (**Harkat-Madouri et al., 2015**). Les huiles essentielles sont dotées des odeurs bien définies, qui peuvent être détectées à très faible concentration. Elles sont également appelées huiles en raison de leur nature liquide à température ambiante, différentes totalement des huiles fixes (qui sont composées de mélanges naturels de lipides) en termes de propriétés chimiques et physiques, et sont composées d'une grande variété de composants organiques naturels avec différents groupes fonctionnels et structures moléculaires. Elles sont largement utilisées dans divers pays comme médicaments, parfums, cosmétiques et conservateurs alimentaires (**Oladipupo et al., 2013**). Elles ont été utilisées comme médicaments au 19<sup>e</sup> siècle en raison de leur arôme et de leur saveur. À ce jour, 3 000 HEs ont été identifiées et environ 300 types d'HEs sont utilisés en parfumerie en raison de leur arôme élevé (**Burt, 2004**).

Les HEs sont des métabolites secondaires qui jouent un rôle important dans le mécanisme de défense des plantes et possèdent donc diverses propriétés médicinales, notamment une activité antimicrobienne. En 1881, De la Croix a signalé pour la première fois que les métabolites secondaires, en particulier les vapeurs d'HEs, avaient des effets antimicrobiens (**Tajkarimi, 2010**). Depuis lors, les HEs et leurs phytoconstituants se sont révélés présenter un large éventail d'activités biologiques, notamment des activités antibactériennes (**Oussalah et al., 2007**), insecticides (**Kim, Soon-II et al., 2003**), antivirales (**Schnitzler et al., 2007**) et antifongiques (**Fitzgerald et al., 2003**).

En raison de leur arôme, de leur saveur et de leur contenu antimicrobien naturel, les HEs sont principalement utilisées dans l'industrie alimentaire pour la conservation des aliments. Par exemple, les HEs extraites des agrumes, telles que les monoterpènes, les sesquiterpènes et les dérivés oxygénés, présentent une forte activité inhibitrice contre les bactéries pathogènes, ce qui suggère leur utilisation en tant qu'agents aromatiques et antioxydants (**Saceda, 2011**).

Des facteurs physiques, chimiques et quelques facteurs microbiologiques sont essentiels à la conservation des aliments. Depuis de nombreuses années, les fabricants et les consommateurs utilisent des conservateurs synthétiques dans l'industrie alimentaire, mais l'utilisation de conservateurs synthétiques et leur consommation peuvent entraîner des effets allergiques, des intoxications, des cancers et d'autres maladies dégénératives (**Sauceda, 2011**).

C'est pourquoi il est nécessaire de rechercher d'autres alternatives. Ces dernières années, les industries alimentaires ont utilisé des extraits de plantes aromatiques et des HEs en

raison de leur capacité à contrôler la croissance des micro-organismes pathogènes. Les HEs extraites de la cannelle, de l'origan et du thym présentent des activités antimicrobiennes significatives contre divers micro-organismes, notamment *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus thermosphacta* et *Pseudomonas fluorescents* (Mith, Hasika et al., 2014).

Le rendement d'extraction des huiles essentielles est faible, ce qui explique le prix élevé de ces composés. A titre d'exemple, 100 Kg de plantes fraîches permettent d'obtenir 500 à 850 g d'huile essentielle de lavande officinale (*Lavandula officinalis*). Le rendement d'une huile essentielle est le critère le plus utilisé dans la détermination du prix (Source : hifamilies.fr).

La famille des *Lamiacées* est connue comme l'une des plus grandes familles comprenant l'un des groupes les plus distinctifs de plantes à fleurs. Cette famille est bien connue pour la richesse de ses espèces et les propriétés médicinales qui sont associées. Elle est largement utilisée depuis les temps les plus reculés (Kocabas et Karaman, 2001).

Le genre *Thymus*, qui compte environ 215 espèces, également appelé "Zaatar" en dialecte algérien, est une plante aromatique vivace bien connue qui appartient à la famille des *Lamiacées* (Amiri, 2012). Le centre d'origine de ces genres est supposé être la région méditerranéenne (Azaz et al., 2004) et dans la flore iranienne, 14 espèces ont été décrites, dont quatre sont endémiques (Safaei-Ghomi et al., 2009). Le *Thymus* a toujours été considéré comme une plante médicinale à travers l'histoire, en raison de différentes substances chimiques complexes. Les HEs, les flavonoïdes et les composés phénoliques obtenus produisent une action physiologique définie sur le corps humain (Edeoga et al., 2005). Le thym et son huile volatile sont utilisés depuis longtemps pour traiter les infections des voies respiratoires supérieures, les symptômes de la bronchite, les infections parasitaires, le prurit associé à la dermatite, les contusions et les entorses (Thosar et al., 2013).

De nos jours, l'HE de Thym est généralement utilisée comme expectorant dans la toux associée au rhume et également en dentisterie comme désinfectant. Elle exerce un effet antibactérien sur les bactéries Gram-positives et Gram-négatives et possède une activité antivirale (virus de l'herpès simplex de type I, rhinovirus humains et virus de la grippe), antifongique, antioxydante, anti-inflammatoire et spasmolytique. L'huile essentielle de Thym a également des activités antibactériennes marquées (Kaloustian, 2005; Nasir et al., 2015).

Par exemple, l'HE de *T. vulgaris* s'est avérée efficace contre *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. coli* et *P. aeruginosa* (Niculae et al., 2009).

L'activité antibactérienne des HEs de thym est associée à leurs différents composants. L'efficacité des constituants est basée sur les groupes fonctionnels qu'ils possèdent et peut être classée en phénols, aldéhydes, cétones, alcools, esters et hydrocarbures par ordre décroissant (Figueiredo et al., 2008).

Le *Thymus vulgaris* est l'une des plantes médicinales et aromatiques (PMA) les plus utilisées, en raison de nombreuses propriétés thérapeutiques de son huile essentielle. La croissance de la plante, le rendement en biomasse, la teneur en huile essentielle et sa composition sont influencés par le chémotype, les conditions environnementales, les techniques de culture et le développement végétatif. Étant donné que la culture des PMA accorde une attention particulière à la qualité de la matière première, l'adoption de méthodes d'agriculture durable est d'une importance capitale (Najar, 2023).

De sa part, le *Thymus fontanesii* est une plante aromatique propageant activement et très utilisée dans la médecine traditionnelles par les populations locales en raison de ses caractéristiques médicinales importantes (Hadouchi et al., 2009).

Le recensement des plantes du territoire national ainsi que leur valorisation surtout dans l'industrie pharmaceutique afin de produire des nouveaux médicaments est devenue une priorité des autorités nationales.

L'objectif de cette étude est la valorisation des deux plantes aromatiques de thym le *Thymus vulgaris* de la région de Tiaret et le *Thymus fonetanesii* de la région de Tissemsilt et étudier les caractéristiques physicochimiques de leurs huiles essentielles et évaluer leur activité antibactérienne.

# **CHAPITRE I**

## **MATERIEL ET METHODES**

## **L'objectif de travail :**

L'extraction des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et de *Thymus fontanesii* et la détermination des caractéristiques physicochimiques( indice d'acide- indice de saponification- indice d'ester- pH), et l'évaluation de l'activité antibactérienne vis-à-vis de quatre souches bactériennes *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli* ,*Pseudomonas aeruginosa*, et *Bacillus cereus* ,

## **II. Matériel et méthodes**

### **II.1. Matériel végétale**

#### **II.1.1. Lieu et période de récolte**

Deux plantes médicinales et aromatiques ont été utilisées au cours de cette étude; *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii*. Le matériel végétal a été amené de deux stations différentes:*Thymus vulgaris* de la région d'Ain Hdid, dans la wilaya de Tiaret et *Thymus fontanesii* de la région de Bordj Bounaama, dans la wilaya de Tissemsilt.

Après la récolte durant les mois de Février et Mars 2023. Nos échantillons ont été bien séchés puis conservé dans un bocal en verre jusqu'au moment de l'extraction.

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par la technique d'hydrodistillation au niveau du laboratoire de biochimie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun, Tiaret.

#### **1.1.1. Station 01 : Ain Hdid**

Nous avons acheté la plante de *Thymus vulgaris* dans une épicerie de la commune d'Ain Hdid qui se trouve à 68Km de la wilaya de Tiaret (**Figure 01**).



**Figure01 :** Localisation de la commune d'Ain Hdid dans la wilaya de Tiaret (Source : <https://fr.wikipedia.org/wiki/ainHdid>).

### 1.1.2. Station 02 : Bordj Bounaama

Le *Thymus fontanessii* a été cueillie dans la commune de Bordj Bounaama située dans la wilaya de Tissemsilt, qui se trouve à 101,9Km de la wilaya de Tiaret(**Figure 02**).



**Figure02 :** Localisation de la commune de Bordj Bounaama(Source : [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/cd/DZ\\_38\\_Bordj\\_Bou\\_Naama.svg/langfr-280px-DZ\\_38\\_Bordj\\_Bou\\_Naama.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/cd/DZ_38_Bordj_Bou_Naama.svg/langfr-280px-DZ_38_Bordj_Bou_Naama.svg.png))

## II.1.2. Classification des deux plantes

**Tableau 01 : Classification botanique de *Thymus vulgaris***

Règne	Plantes
Sous règne	<i>Plantes vasculaires</i>
Embranchement	<i>Spermaphyte</i>
Sous embranchement	<i>Angiosperme</i>
Classe	<i>Dicotylédone</i>
Sous classe	<i>Dialypétales</i>
Ordre	<i>Labiales</i>
Famille	<i>Lamiacées</i>
Genre	<i>Thymus</i>

**Tableau 02 : Classification botanique de *Thymus fontanesii***

Règne	Plantes
Embranchement	<i>Spermaphytes(phanérogames)</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Sous classe	<i>Métachlamydées(gamopétales)</i>
Ordre	<i>Tubiflorales</i>
Famille	<i>Labiées</i>
Genre	<i>Thymus</i>

## II.2. Protocole expérimentale

### II.2.1. Sèchage et préparation de la plante

Les feuilles des plantes de *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii* ont été sèchées à la température de laboratoire pendant 15 jours. Ensuite, le matériel végétal a été conservé dans des flacons en verre hermétiquement fermés jusqu'à l'extraction.

### II.2.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

L'hydrodistillation est une méthode très simple et très utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. Son principe est très simple et ne demande pas un appareillage sophistiqué (Brain, 1995). L'hydrodistillation peut durer plusieurs heures (Lucchesi et al.,

2004). Elle consiste à immerger la matière végétale dans un ballon rempli d'eau distillée, que l'on porte ensuite à l'ébullition. Lorsqu'on chauffe le ballon qui contient la solution aqueuse la vapeur détruit les cellules végétales qui libèrent des molécules odorantes, celles-ci sont emportées par la vapeur qui est ensuite refroidie dans un condenseur (**Figure 03**).

Le distillant est transféré dans une ampoule à décanter et on laisse 24h afin de séparer l'eau d'huile.

**Tableau 03** : Conditions opératoires de l'hydrodistillation des deux plantes médicinales

Matière végétale	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus fontanesii</i>
Quantité de la matière végétale (g)	100	75
Quantité d'eau (ml)	1000	600
Température (°C)	100	100
Temps d'hydrodistillation (Heures)	3	2,5



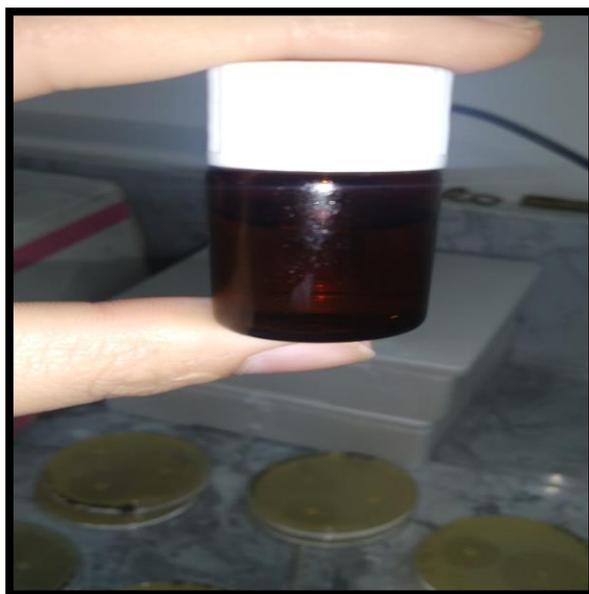
**Figure 03** : Dispositif d'hydrodistillation (Photo originale).

### II.2.3. Conservation des huiles essentielles

Après la récupération de l'HE, on ajoute du sulfate de magnésium et on laisse réagir pendant 15min pour éliminer toute trace d'eau puis les huiles sont conservées dans des tubes en verre hermétiquement fermés à basse température à 4 °C et à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation (Haddouchi et *al.*,2009; Bousbia, 2011; Giweli et *al.*,2013) (Figure04 et Figure05).



**Figure04** : Huile essentielle de *Thymus fontanesii*(Photo originale)



**Figure05** : Huile essentielle de *Thymus vulgaris* (Photo originale)

#### II.2.4. Détermination de rendement

Le rendement en HEs est définie comme étant le rapport entre la masse d'HE récupérée et la masse de la matière sèche à traiter. Il est exprimé en pourcentage (Carré,1953;Bekhachi, 2002) .

➤ Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$RHE\% = \frac{MHE}{Ms} \times 100$$

- **RHE** : Rendement en huile essentielle en %.
- **MHE** : Masse d'huile essentielle en gramme.
- **Ms** : Masse de la plante sèche en gramme.

#### II.3.Détermination des propriétés physicochimiques d'HE

##### II-3-1 Indice physique

##### II.3.1.1.pH : le potentiel hydrogène

C'est un indice permettant de mesurer l'activité chimique des protons des ions hydrogène H<sup>+</sup> en solution.

La détermination du pH se fait par bandelette ou pH-mètre.



**Figure 06 :** Bandelette de pH (Photo originale).



**Figure07 :** pH mètre (Photo originale).

### II.3.2. Indices chimiques

Afin de déterminer les indices chimiques tels que : l'indice d'acide, saponification et d'ester, nous avons utilisé des méthodes conformes aux normes de l'association française de normalisation(AFNOR).

#### II-3-2-1 Indice d'acide

##### a-Définition

L'indice d'acide est la quantité en milligramme d'hydroxyde de potassium(KOH) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres (AGL) contenus dans le corps gras (huile essentielle) (AFNOR)

##### b-Mode opératoire

On pèse 0,5g d'HE et on l'introduit dans un erlenmeyer en verre, puis on ajoute 5ml d'éthanol à 95 %et 5 gouttes de phénolphétalines (pp) à 0,2%. Ensuite, on neutralise grâce à une solution éthanique de KOH (0,1 mol/l) jusqu'à l'obtention de la couleur rose.

##### c-Méthode de calcul

L'indice d'acide est calculé par la formule suivante (Wolff, 1968) :

$$IA = \frac{(56,1 \times V \times N)}{p} \text{ mg de KOH / g d'huile}$$

- **V** : Volume en ml d'hydroxyde de potassium (0.1N) nécessaire au titrage.
- **N** : Normalité de solution d'hydroxyde de potassium (0.1N).
- **P** : masse (g) de la prise d'essai.
- **56.11** : Masse molaire, exprimé en g /mol, d'hydroxyde de potassium.

#### II.3.2.2. Indice de saponification

##### a-Définition

L'indice de saponification est la quantité en milligramme d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour saponifier un gramme de matière grasse, il est mesuré selon le protocole décrit par la norme NF.T60-206(AFNOR, 1984).

### b-Mode opératoire

On pèse 0,5g d'HE dans un ballon puis on ajoute 25ml de KOH (0,5mol/l), puis on place le ballon dans un bain marie pendant 45 à 60 min. ensuite, on ajoute 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine (**Figures 08 et 09**).

Un essai à blanc a été réalisé dans les mêmes conditions.

### c- Méthode de calcul

L'indice de saponification est calculé par la formule suivante (**Wolff, 1968**) :

$$I_S = \frac{V_0 - V}{P} \times N \times 56,11$$

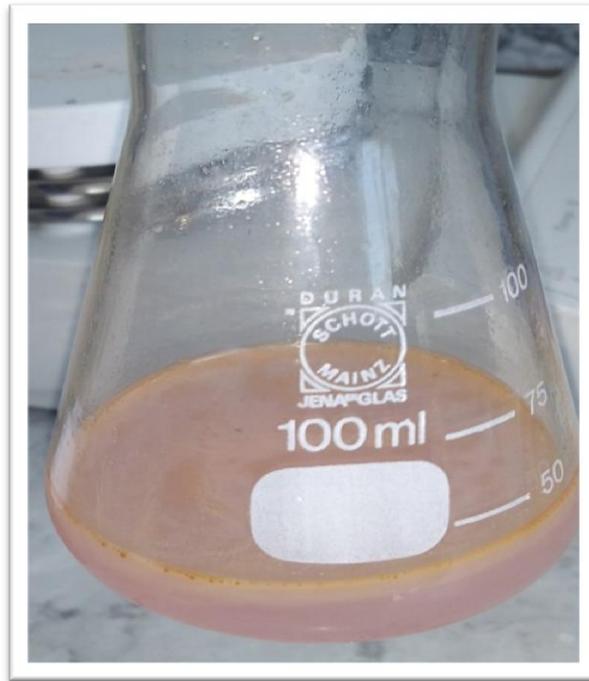
- $V_0$  : volume en ml de HCl utilisé pour l'essai à blanc.
- $V$  : volume en ml de HCl utilisé pour l'échantillon à analyser.
- $P$  : prise d'essai en grammes.
- $N$  : normalité de KOH (0,5 mol/l).
- **56,11** : poids moléculaire de KOH.

### II.3.2.3 Indice d'ester

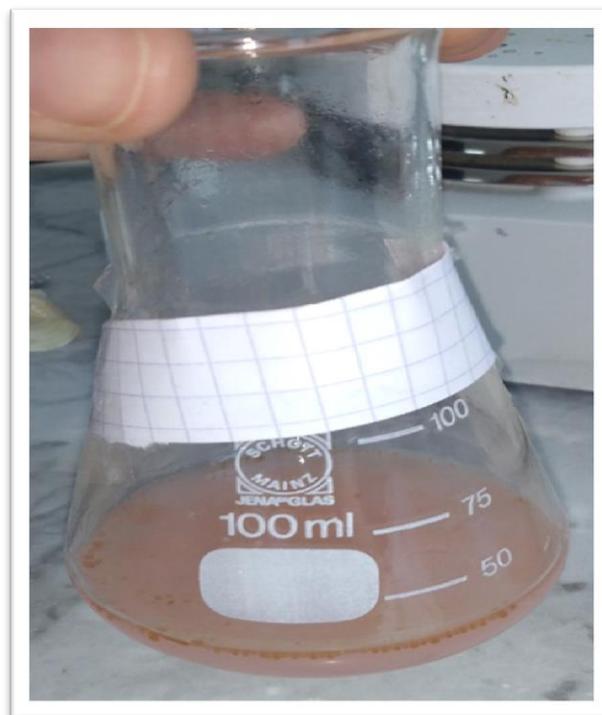
C'est le nombre d'hydroxyde de potassium (KOH) exprimé en (mg) nécessaire pour neutraliser l'acide libéré par l'hydroxyde d'ester dans 1 gramme de corps gras.

L'indice d'ester est donné par la formule suivante :

**IE=indice de saponification- indice d'acide**



**Figure08** : Détermination de l'indice de saponification d'HE de *Thymus vulgaris* (Photo originale).



**Figure09** : Détermination de l'indice de saponification d'HE de *Thymus fontanesii*(Photo originale)

## II.4 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne est réalisée par la méthode d'aromatogramme qui détermine la sensibilité des différentes souches bactériennes et par la méthode de microdilution pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales bactéricides vis-à-vis des souches testées.

Ce test est évalué au niveau du laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université Ibn khaldounm Tiaret.

L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure de la zone d'inhibition (**El amri et al.,2014**).

### II.4.1 Souches bactériennes

L'activité antibactérienne des HEs de *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii* est effectuée sur quatre souches bactériennes appartenant à deux catégories (Gram+ et Gram-), ces souches sont :

- *Staphylococcus aureus* (Gram+);
- *Escherichia coli* (Gram-);
- *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-);
- *Bacillus cereus* (Gram+).

### II.4.2 Repiquage

Des ensemencements de souches bactériennes ont été effectués sur différents milieux selon la méthode des stries simples, la gélose Heckton pour *Escherichia coli*, la gélose Chapman pour *Staphylococcus aureus*, ainsi que le milieu Cetrimide pour *Pseudomonas aeruginosa* et finalement la gélose nutritive pour *Bacillus cereus*. Toutes les boîtes ont été placées dans un incubateur à température de 37°C pendant 24 heures (**Figure 10**).



**Figure 10 : Milieux de culture utilisés (Photo originale)**

### **II.4.3 Tests de confirmation**

#### ➤ **Coloration de Gram**

On dépose des lames propres sur un porte lame et on dépose des colonies pures de différentes souches de bactérie (*E.coli*, *S. aureus*, *B.cereus*, *P. aeruginosa*) sur une goutte d'eau distillée, puis on sèche le frottis et on le fixe, et on le couvre avec le violet de gentiane puis on laisse agir pendant 1min, après on verse l'excès de violet et on couvre le frottis avec le lugol, on laisse agir 30sec. Ensuite on rince la lame avec l'alcool à 96° puis avec l'eau distillée. On recolore avec la fuchsine et on laisse agir pendant 1min, enfin on rince le frottis avec l'eau distillée et on sèche avec le papier buvard.

L'observation se fait au microscope optique avec l'objectif G\*40 puis Gx100 avec l'huile à immersion.

Les bactéries qui prennent la couleur violette sont des bactéries à Gram+.

Et les bactéries qui prennent la couleur rose sont des bactéries à Gram-.

#### ➤ **Test de catalase**

Est un test fondamentale pour l'identification des bactéries à Gram+, nous l'avons utilisé dans cette présente étude pour confirmer nos souches référenciées. La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

### **Mode opératoire**

On dépose une goutte d'eau oxygéné (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sur une lame puis on ajoute une colonie de souche à tester à l'aide d'une anse de platine. Une réaction positive se traduit par la formation des bulles.

#### ➤ **Test d'oxydase**

Le test d'oxydase est un test fondamental pour orienter l'identification des bactéries à Gram-.

### **Mode opératoire**

Sur une lame propre et sèche on dépose une goutte d'eau distillée puis des colonies de bactérie et enfin on ajoute un disque d'oxydase.

Si le substrat présente une tâche violette, alors le substrat a été oxydé.

#### ➤ **Test d'ONPG**

**ONPG** : L'o-Nitrophényl-B-D-galactopyranoside

### **Mode opératoire**

On dépose des colonies de bactérie dans une suspension d'eau physiologique puis on ajoute un disque ONPG, on place les tubes à l'étuve à 37°C pendant 24h.

Une couleur jaune indique un résultat positif (**Figure 11**).



**Figure 11** : Test d'ONPG des souches bactériennes (Photo original)

#### **II-4-4 méthode de diffusion sur un milieu gélosé :(Aromatogramme)**

##### **Principe**

Pour évaluer l'activité antibactérienne des HEs de *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii*, nous avons utilisé la méthode d'aromatogramme sur un milieu gélosé. La gélose de Muller Hinton stérile est coulée dans des boîtes de Pétri et laissées refroidir.

##### **➤ Préparation de l'inoculum bactérien standard**

A partir des cultures bactériennes jeunes de 18h, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques à été prises et mises dans des tubes contenant 9ml de solution d'eau physiologique. La suspension bactérienne a été agité pendant 15sec à l'aide d'un vortex, la densité optique de chaque suspension a été confirmée sur un spectre UV visible, l'absorbance doit être comprise entre 0,08 et 0,13 (selon l'échelle de Mc Farland 0.5) (Arab et al., 2014).

##### **➤ Ensemencement**

Couler respectivement la gélose MH dans des boîtes de Pétri bien stérile jusqu'à une épaisseur de 4mm (un volume de 20ml) et laisser les refroidir sur la pailleuse, avec un écouvillon imbibé dans la suspension bactérienne standard, étaler la surface de la gélose à en tournant la boîte à chaque fois à 60°.

A l'aide d'une pince métallique stérile, prélever un disque de cellulose stérile (papier buvard d'un diamètre de 6mm) puis l'imbiber avec 10  $\mu$ l d'HE et le déposer sur la gélose MH. Utiliser des disques de chloramphenicol 30 $\mu$ g comme témoin positif tandis que des disques imbibés de 10 $\mu$ l d'eau physiologique ont été utilisés comme témoin négatif. Cette expérience a été réalisée en triplicata.



**Figure 12** : Préparation du milieu de Müller Hinton(Photo original)

### ➤ Incubation

Toutes les boîtes de Pétri ont été incubées à l'étuve à une température de 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture**

La lecture se fait en mesurant la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle (mm). Selon **ponce et al. (2003)** et **Moreira et al. (2005)**, la sensibilité des germes a été classée comme suit :

Diamètre moins de 8mm : résistante

Diamètre de 9 à 14 mm : sensible (+).

Diamètre de 15 à 19 mm : très sensible (++).

Diamètres plus de 20 mm : extrêmement sensible (+++).

#### **II-4-5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles essentielles des plantes étudiées par la technique de microdilution**

La CMI de l'huile essentielle a été déterminée contre 04 souches bactériennes référenciées, la détermination de la CMI des huiles essentielles des *Thymus vulgaris* et celle de *T. fontanesii* a été effectuée par la technique de microdilution en utilisant des microplaques stériles avec 96 (12 x 08) puits avec un plat profond et un couvercle approprié (**Viljoen et al., 2003; Sahin et al., 2004**).

Cette technique consiste à ensemercer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance de 90% de la population microbienne.

Une microdilution des huiles essentielles à tester, est produite dans une microplaque. La gamme de concentration est alors produite dans les 96 puits, 50µl de l'huile essentielle sont ajoutés dans le premier puits de chaque ligne, puis des dilutions doubles ont été effectuées dans le bouillon Mueller Hinton (BMH). Ensuite 5µl de l'inoculum standard ont été ajoutés à chaque puits. Chaque ligne est réservée pour une souche déterminée avec répétition. Des puits contenant de BMH inoculé par la souche déterminée sont utilisés comme contrôles positifs, ceux contenant le BMH non inoculés sont utilisés comme contrôle négatif. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la CMI de l'huile essentielle est déduite à partir du premier puits de la

gamme dépourvue de croissance microbienne. La lecture s'effectue en utilisant un indicateur coloré le 2,3,5-diphényltétrazolium chloride [TTC, le rouge tétrazo-lium] diluée dans de l'eau distillée stérile, à une concentration de 0.5% après 21h d'incubation. Par l'ajout de 20µl de TTC suivit d'une 2<sup>ème</sup> incubation pendant 3h à 37°C, le TTC révèle la présence de bactéries vivantes par l'apparition d'une coloration rouge (**Eloff ,1998**).

La concentration minimale bactéricide(CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9% de l'inoculum microbien initial (soit moins de 0,1% de survivants) (**Skandamis et al., 2001**). Elle définit l'effet bactéricide ou bactériostatique d'une huile essentielle.

10µl de la suspension bactérienne sont repiqués à partir des puits montrant une absence complète de la accroissance bactérienne puis déposés « en strie » sur gélose Muller Hinton. Les boîtesensemencées sont incubées pendant 24heures à 37°C.

# **CHAPITRE II**

## **Résultats et discussion**

### III-1 Rendement en huile essentielles

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale utilisée (Afnor, 1986).

Les résultats de RHE sont mentionnés dans le Tableau (04)

**Tableau 04 : Rendement en huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii* obtenu par hydrodistillation**

Rendement %	RHE1	RHE2	RHE3	RHE4	Moyenne	écart type
<i>T.vulgaris</i>	1,057	1,12	1,021	1,05	1,062	0,042
<i>T .fontanesii</i>	1,059	1,083	0,754	1,364	1,065	0,249

Le rendement en huiles essentielles des plantes étudiées *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii* sont respectivement 1,062 % et 1,065% (Tableau 04).

Le rendement de HE de *Thymus vulgaris* moyen en huile essentielle a été calculé sur la base de la matière sèche. Il est relativement faible par rapport à certaines plantes qui sont exploitées industriellement comme source des huiles essentielles (El Ouali Lalami et al., 2013).

De nombreux facteurs influencent le rendement, la teneur, les caractéristiques physico-chimiques et la composition chimique des huiles essentielles tels que l'espèce, les conditions environnementales, la technique d'extraction, le séchage, la période et le milieu de récolte, les pratiques culturales et l'âge du matériel végétal (Aberchane et al., 2001).

Le rendement de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de *Thymus fontanesii* obtenu (1,062% et 1,065%) est inférieur à celui rapporté par Tohami, 2017 sur une autre espèce de Thym (*Thymus numidicus*) qui est proche à 2,85%.

Les rendements rapportés dans la littérature dans différentes régions d'Algérie de l'HE de *Thymus* varient entre 1,12 % et 4,2% avec la plus grande valeur pour l'espèce de Tlemcen. Ces rendements sont relativement proches de ceux trouvés chez la même espèce dans

différentes régions du monde, en effet le rendement varie de 0,25% à 5,0 % avec la plus grande valeur pour l'espèce de Jordanie (**El OualiLalami et al., 2013**).

### **III-2 Caractéristiques organoleptiques**

Les caractéristiques organoleptiques (couleur, odeur et aspect) des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii* sont regroupées dans le Tableau 05.

### **III-3 Caractéristiques physicochimiques d'HEs**

Le contrôle de l'huile essentielle se fait par la détermination des paramètres physico chimiques qui seront utilisées pour décrire l'huile et servir de critères de qualité de l'huile. Les méthodes de détermination des caractéristiques physico-chimiques sont décrites dans le recueil de normes publié par l'Association Française de Normalisation (**AFNOR, 1989**).

Les résultats obtenus des analyses physicochimiques indiquent que l'échantillon analysé se trouve dans les fourchettes de référence établies par les normes AFNOR. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 06.

**Tableau 05 :** Caractéristiques organoleptiques de l'HEs de *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii*

	<b>HE. <i>Thymus fontanesii</i></b>		<b>HE. <i>Thymus vulgaris</i></b>	
<b>Caractéristiques</b>	<b>Normes (AFNOR, 2000)</b>	<b>Résultats obtenus</b>	<b>Normes (AFNOR, 2000)</b>	<b>Résultats obtenus</b>
<b>Aspect</b>	Liquide mobile et limpide	Liquide	Liquide mobile	Liquide
<b>Couleur</b>	jaune pâle	jaune foncée	Couleur traditionnellement allant du brun au brun-rouge	Jaune clair
<b>Odeur</b>	Très aromatique Epicée rappelant celle du thymol	Epicée rappelant celle du thymol	Odeur caractéristique aromatique, phénolique (thymol) avec un fond légèrement épicé	Forte à piquante

**Tableaux 06 :** Valeurs des indices physicochimiques des HEs

<b>Caractéristiques</b>	<b><i>Thymus vulgaris</i></b>	<b><i>Thymus fontanesii</i></b>
<b>Indice d'acide</b>	0,25	0,39
<b>Indice de saponification</b>	280,55	392,11
<b>Indice de d'ester</b>	280,3	391,72
<b>Ph</b>	5,88	5,60

D'après les résultats mentionnés dans le **Tableau06**, on constate que le pH des huiles essentielles des espèces étudiées est acide (**pH<7**). Il convient de souligner que le pH joue un rôle déterminant au cours des réactions chimiques et biochimiques et peut influencer les propriétés stabilisatrices d'une huile essentielle (effets antioxydant et antimicrobien) (**Mahboub et al., 2019**).

L'indice d'acide (IA) doit être le plus petit possible. Dans notre étude l'indice d'acide d'HE des plantes étudiées *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii* sont respectivement de 0,25 et 0,39 cet indice, certes dans les normes, demeure très faible. Une huile essentielle fraîche contient très peu d'acides libres (**Fauconnier, 2006**).

Ceci est dû au fait que l'huile est placée dans un flacon en verre teinté, car il a été démontré que la lumière modifie la structure de l'huile et provoque la prolifération des acides. En effet, l'huile s'oxyde, se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acidité (**Rached et al., 2022**).

De même, un indice d'acide inférieur à 2 est un indicateur d'une bonne conservation de l'huile (**Steve et Pierre, 2013**) ce qui est le cas de notre huile essentielle.

Par ailleurs, l'indice de saponification permet de caractériser le poids moléculaire et la longueur moyenne des chaînes grasses auxquelles il est inversement proportionnel (**Mahboub et al., 2019**). Pour HE de *Thymus vulgaris*, nous avons enregistré une valeur supérieure à celle du *Thymus vulgaris* marocain qui a enregistré (22,4) (**Elgamouw et al., 2020**).

Dans notre étude, nous avons trouvé que l'indice d'ester d'HE de *Thymus fontanesii* est égal à de 391,72. Ce résultat est très élevé par rapport aux normes **AFNOR 1996** qui est une valeur entre 49,5-52,55. D'autre étude dans la région de Boumerdès par **Mebarki.2010** ont trouvé que l'indice de *Thymus fontanesii* est égale à 51,825, cette valeur est acceptable dans les normes d'**AFNOR**.

Plus la quantité d'ester dans l'huile est importante, plus sa qualité est élevée (**Rached et al., 2022**).

### III.4 Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

#### III.4.1 Tests de confirmation des souches

Après avoir établi les différents tests de confirmation, nous avons obtenu les résultats décrits sur le tableau suivant :

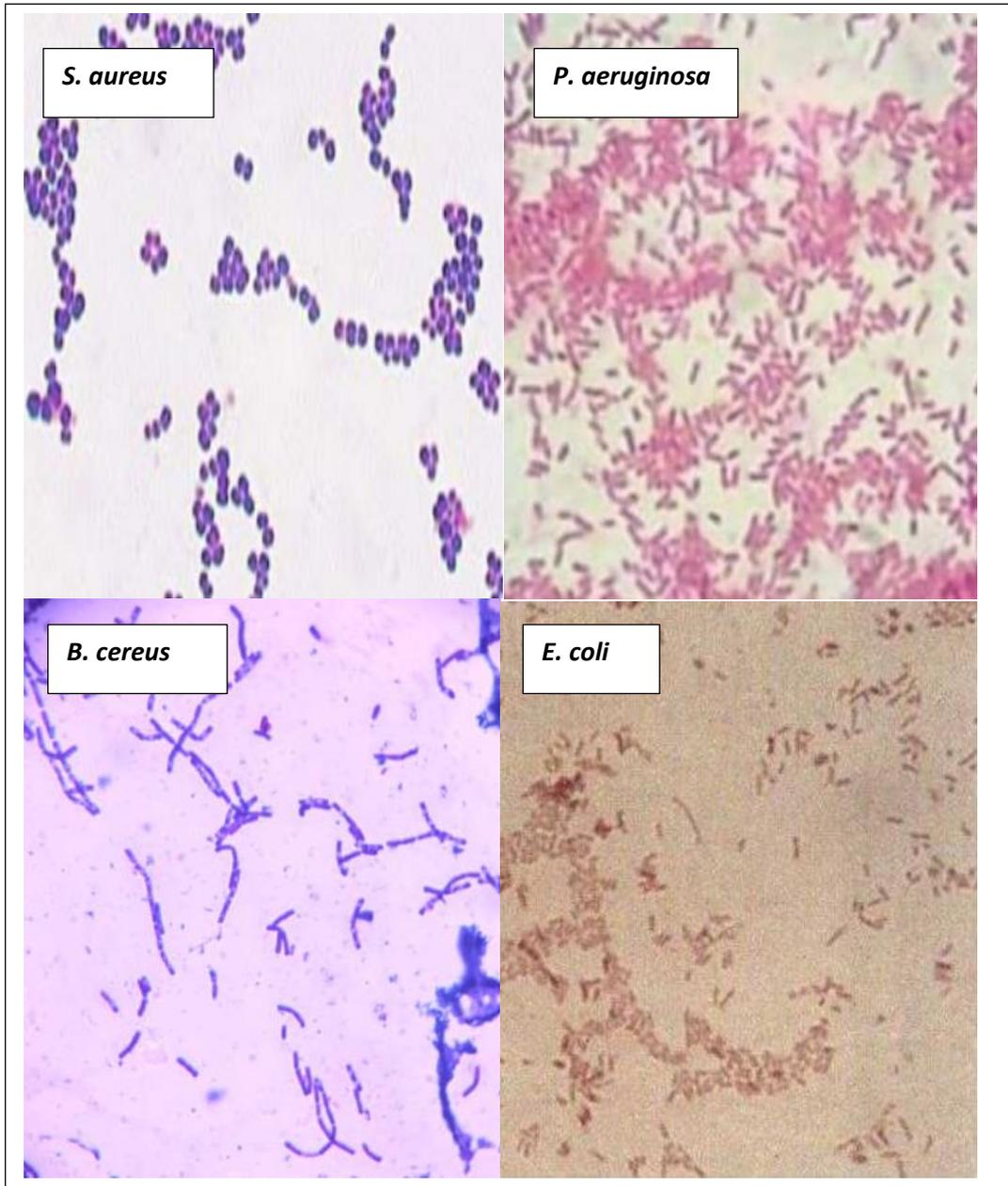
**Tableau 07 : Résultats des tests de confirmation des souches bactériennes**

Souches	Coloration de Gram	Test de catalase	Test d'oxydase	Test d'ONPG
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	-

#### III.4.2 Test de sensibilité :

Après avoir évalué l'activité antibactérienne des HEs de *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii* sur quatre souches bactériennes : *Staphylococcus aureus* (Gram+), *Escherichia coli* (Gram-), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-), *Bacillus cereus* (Gram+) par la méthode de diffusion sur un milieu gélosé (MH) le diamètre mesuré détermine une donnée qualitative de l'inhibition avec comme règle « plus le diamètre d'inhibition est important, plus l'échantillon testé présente une activité antibactérienne importante ».

Les résultats du test de sensibilité obtenus sont illustrés dans le tableau 08 :



**Figure13** : Observation microscopique des quatre souches bactériennes (coloration de Gram)\* 100 (**Photos originales**).

**Tableau 08 :** Zones d'inhibitions (mm) des souches bactériennes :

Huiles essentielles	Souches bactériennes			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Thymus vulgaris</i>	56	57	57	49
<i>Thymus fontanesii</i>	40	42	55	23
Témoin positif «Chloramphénicol»	28	25	23	30
Témoin négatif « eau distillée »	0	0	0	0

D'après nos résultats, nous constatons que les huiles essentielles de *T. vulgaris* témoignent une forte activité antibactérienne, et la plus importante a été observée avec l'HE de *T. vulgaris* contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* avec un diamètre d'inhibition environ (57mm) et pour *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre de 56mm et 49mm respectivement. Nos résultats sont en accord avec les résultats réalisés par **Cheurifa et al.(2013)** qui ont montré que l'huile essentielle de *T. vulgaris* témoigne une activité antibactérienne intéressante sur les bactéries à Gram + comme sur les bactéries à Gram- avec un diamètre variant de 22,00mm à 45,00mm.

En revanche, nous trouvons que l'HE de *T. fontanesii* à une forte activité antibactérienne, les diamètres d'inhibition sont supérieurs à 20 mm. On remarque que *Pseudomonas aeruginosa* est montré peu sensible à l'action de l'huile essentielle de *T. fontanesii* par rapport aux autres bactéries testées, avec un diamètre de 23 mm. Cette faible sensibilité est due à la nature de sa membrane externe qui lui confère la résistance à la plupart des agents biocides. Le plus grand diamètre d'inhibition est obtenu avec *Bacillus cereus* (55mm), cette espèce donc est la plus sensible à l'huile essentielle de *T. fontanesii*.

Nos résultats sont similaires aux résultats de **Haddouchiet al. (2009)** qui ont montré que l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* présente une activité antibactérienne significative contre toutes les bactéries sauf *Pseudomonas aeruginosa* et leur diamètre variait entre 8mm et 20mm.

Cette grande activité antibactérienne de ces huiles essentielles est liée à la présence des phénols (thymol, carvacrol) qui y sont majoritaire. **Valero et al. (2006)** ont prouvé la perméabilité de la membrane cellulaire des bactéries qui réduit la force promotrice et diminue ainsi le taux intracellulaire d'adénosine triphosphate ou ATP. Plus les teneurs en phénol sont élevées plus les HEs sont efficaces (**Zahiri, 2006; Mebarki, 2010**).

Généralement toutes les huiles essentielles sont plus efficaces vis-à-vis des bactéries Gram + que Gram -. Les bactéries à Gram- sont plus résistantes aux huiles essentielles grâce à leur membrane externe (**Zakia, 1988**).

Ainsi, la structure de la paroi cellulaire à Gram + permet aux molécules hydrophobes de pénétrer facilement dans les cellules et d'agir à la fois sur la paroi cellulaire et à l'intérieur du cytoplasme, par contre les bactéries à Gram - caractérisées par la présence de lipopolysaccharides qui englobent la couche bactérienne de peptidoglycane limitant la diffusion des composés hydrophobes dans le cytoplasme.

D'autre part, les résultats du test de sensibilité des huiles essentielles des deux plantes aromatiques *T. vulgaris* et *T. fontanesii* ont montré que ces deux plantes témoignent une activité antibactérienne intéressante et donc plus active sur l'ensemble des souches testées. Selon l'interprétation de la sensibilité des bactéries déterminée par **ponce el al. (2003)**, nous constatons que toutes les bactéries testées dans cette étude sont montrées extrêmement sensibles mais avec des spectres variables (**Figures 15 et 16**).

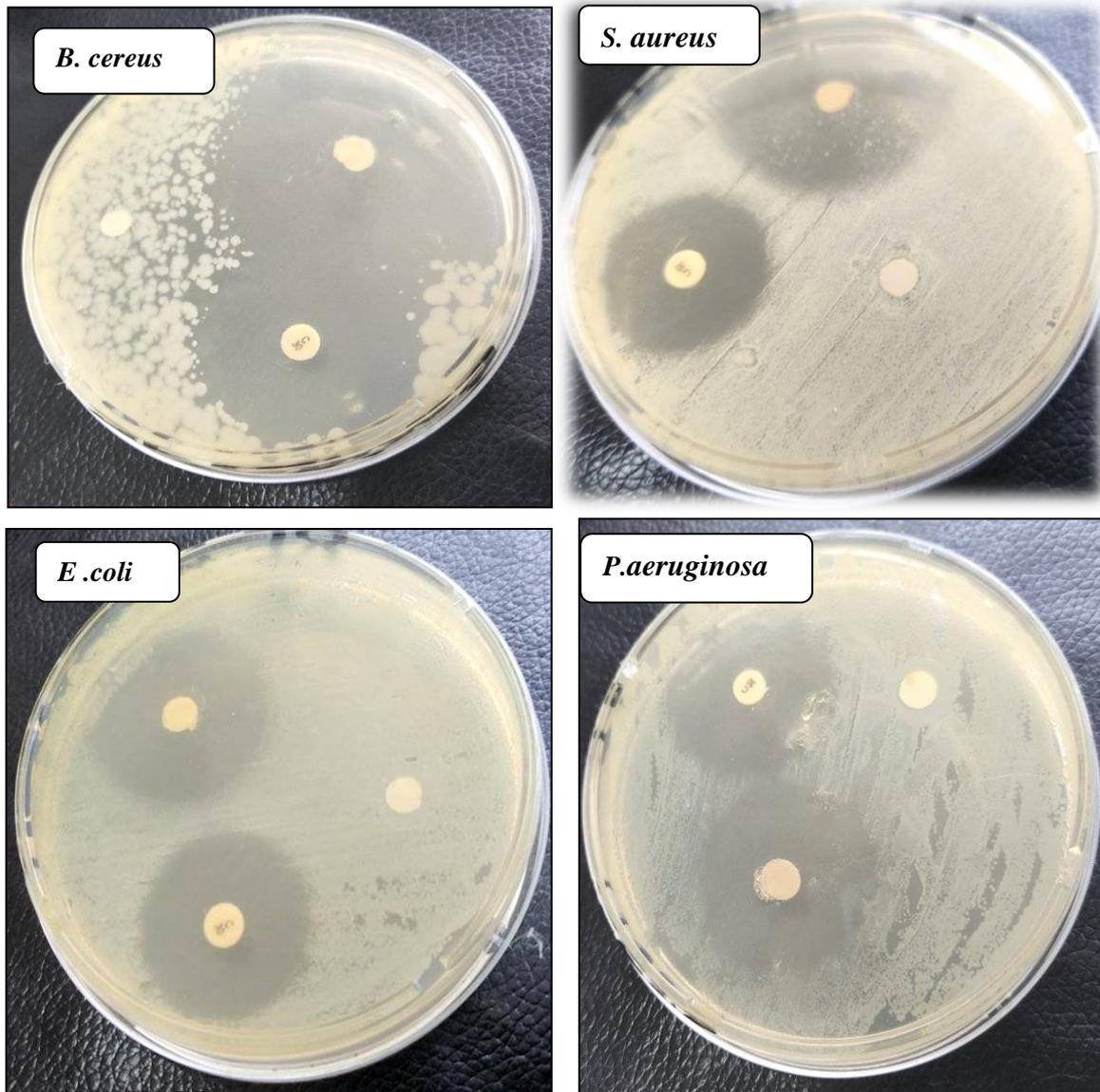
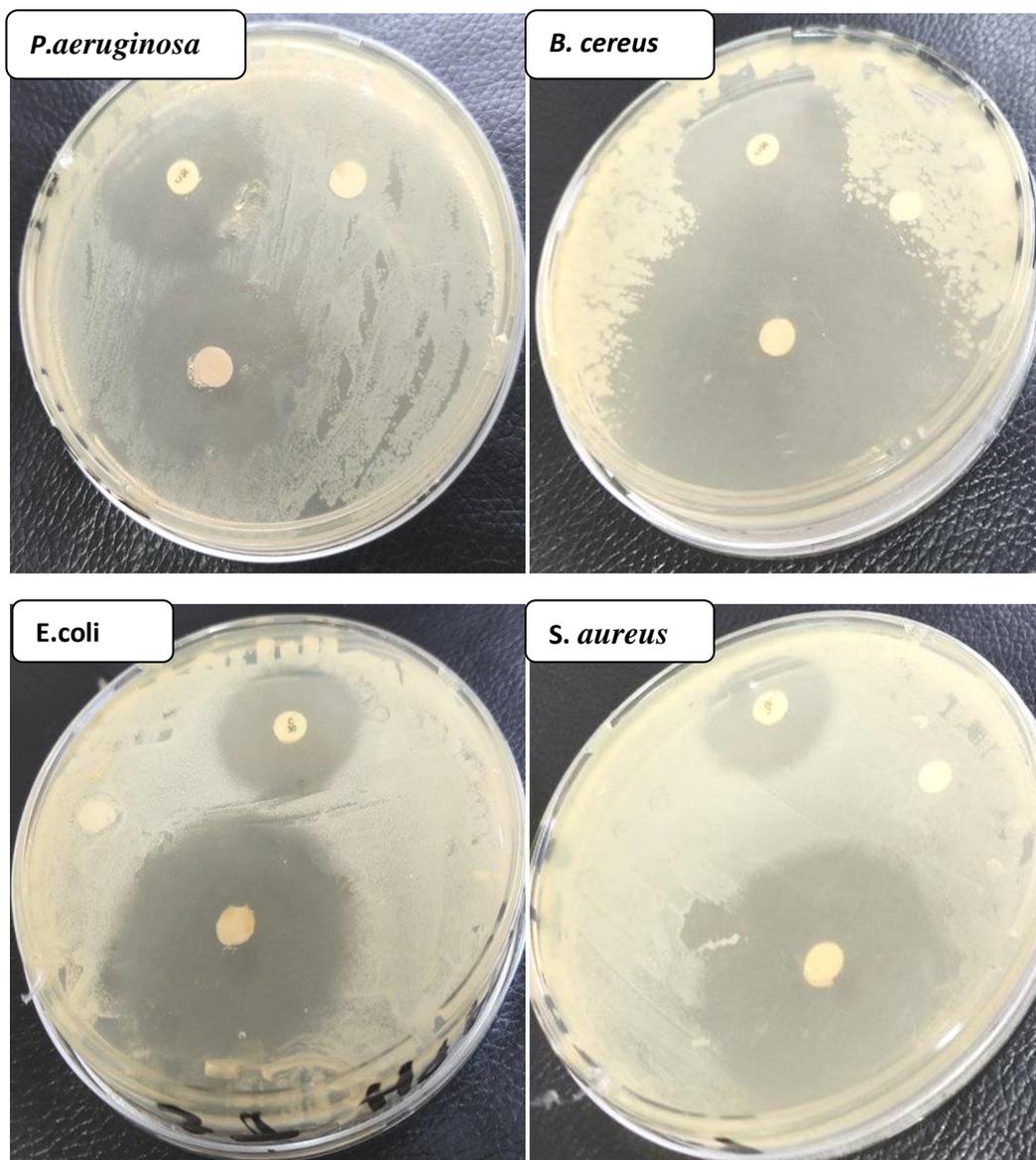


Figure 14 : Test de sensibilité des différentes souches bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.



**Figure 15 :** Test de sensibilité des différentes souches bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*.

### III.4.3 Détermination des concentrations minimales inhibitrice et les concentrations minimales bactéricides des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et de *Thymus fontanesii* vis-à-vis des souches testées :

La détermination des paramètres d'inhibition (CMI) et (CMB) nous a permis non seulement de confirmer les résultats obtenus mais aussi de quantifier l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii*.

Les résultats des CMI et CMB des deux huiles essentielles vis-à-souches : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau 09** : CMI et CMB des deux huiles essentielles testées exprimées en µl/ml:

Souches	HE de <i>Thymus vulgaris</i>			HE de <i>Thymus fontanesii</i>		
	CMI	CMB	CMB/CMI	CMI	CMB	CMB/CMI
* <i>Escherichia coli</i>	1,562	1,562	1	1,56	>50	>4
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,781	>25	>4	1,56	>50	>4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,781	>25	>4	1,56	>50	>4
<i>Bacillus cereus</i>	0,781	>25	>4	1,56	>50	>4

### ***Thymus vulgaris***

Les CMI de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* ont été de 0,781 à 1,562 µl/ml vis-à-vis des souches testées, ce qui prouve que cette huile possède une activité antibactérienne intéressante contre toutes les souches bactériennes et selon les valeurs illustrées dans le tableau 09, les concentrations minimales inhibitrices de cette huile essentielle vis-à-vis *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont de 0,781 µl/ml, alors que pour *Escherichia coli* est 1,562 µl/ml.

Des CMB supérieures à 25 ont été enregistrées au cours de cette étude chez *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*, sauf pour *Escherichia coli* la CMB a été de 1,562 µl/ml.

Nos résultats sont similaires avec les résultats qui ont été obtenus par **Ettayebi et al. (2000)** qui montrent que l'activité de l'huile de *Thymus vulgaris* a été plus efficace contre les bactéries Gram + (*Staphylococcus aureus*) que contre les bactéries Gram- (*Escherichia coli*).

D'après nos résultats, le rapport CMB/CMI a été supérieur de 4 chez *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*. En se référant à **Bouabdali et al. (2016)**, l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a un pouvoir bactériostatique vis-à-vis des souches bactériennes testées excepté la souche de *Escherichia coli* où le rapport CMB/CMI a été de 1 donc cette huile est considérée comme bactéricide vis-à-vis cette espèce.

### ***Thymus fontanesii***

Les CMI de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* enregistrées ont été égales à 1,56 µl/ml à l'égard des quatre souches étudiées.

Des résultats supérieurs ont été rapportés par **Mohammedi et al. (2016)** qui déclarent que *Thymus fontanesii* à une activité intéressante par rapport aux HEs d'autres plantes aromatiques avec une CMI de 0,75 µl/ml. Selon le tableau 09, nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus par **Haddouchi et al. (2009)** qui montre une absence de la croissance de toutes les souches au niveau de la solution mère, les CMI des souches de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* sont comprise entre 368,76 et 460,95 µg/ml.

Des CMB supérieures à 50 µl/ml ont été enregistrées au cours de cette étude chez toutes les souches bactériennes testées, des résultats supérieurs ont été obtenus par **Baitich et**

*al. (2019)* qui montrent que les CMB des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* sont entre 0,625µl/ml et 1,25µl/ml.

D'après Nos résultats le rapport CMB/CMI a été supérieur à 4µl/ml et selon *Bouabdali et al.(2016)*, nous constatons que l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* a un pouvoir bactériostatique vis –à-vis des souches bactériennes testées.

L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* a exercé une forte activité bactériostatique contre toutes les bactéries, ce grand pouvoir observé est attribué principalement à leurs teneurs élevées en phénols terpéniques (thymol et carvacrol) ou bien liée aux critères écologiques : température, humidité relative, insolation, nature de sol, ainsi que la période de récolte.

Cette étude a permis une fois la mise en valeur de l'exploitation des huiles essentielles, dans le domaine pharmaceutique et cosmétique, par la même occasion, elle confirme leur utilisation comme conservateur dans le domaine de l'industrie agroalimentaire.

# **CONCLUSION**

## Conclusion

L'utilisation des huiles essentielles et de leurs composants remonte à la préhistoire. Cependant, ce n'est qu'avec l'amélioration des techniques analytiques modernes qu'il a été possible d'évaluer l'importance des huiles essentielles pour l'industrie, principalement les domaines de cosmétiques et de l'industrie alimentaire. La tendance actuelle de réduction de l'utilisation des produits de synthèse au profit d'alternatives naturelles fait des huiles essentielles et de leurs composants des alternatives possibles pour cette question.

L'Algérie est riche en plantes aromatiques où elles étaient utilisées dans tous les domaines notamment la médecine et rencontreront un grand succès en phytothérapie.

Le travail que nous avons entrepris porte donc sur l'évaluation des activités antibactériennes de deux espèces de Thym, le *Thymus vulgaris* de la région de Tiaret et le *Thymus fontanesii* de la région de Tissemsilt.

L'extraction des huiles essentielles des deux plantes a été faite par la méthode d'hydrodistillation. Nos résultats ont indiqué que le rendement est de 1,09% pour *Thymus vulgaris* et de 1,33% pour *Thymus fonetanesii*.

En ce qui concerne, les propriétés physicochimiques des deux espèces, nous avons enregistré des indices de saponification de l'ordre de 280,55 et 392,11 pour *Thymus vulgaris* et *Thymus fontanesii* respectivement. Tandis que pour l'indice d'acide, nous avons enregistré des valeurs équivalentes à 0,25 et 0,39 pour *Thymus vulgaris* et *Thymus fonetanesii* successivement. En outre, l'indice d'ester a montré des valeurs égales à 280,3 et 391,72 pour *Thymus vulgaris* et *Thymus fonetanesii*. En ce qui concerne le pH, les deux huiles essentielles présentent un pH acide ; 5,88 vs 5,60 pour *Thymus vulgaris* et *Thymus fonetanesii* respectivement.

Quant à l'activité antibactérienne, nous avons utilisé quatre souches bactériennes, nous avons donc remarqué que les huiles essentielles des deux plantes sont efficaces contre toutes les bactéries testées mais elles avaient un effet plus fort sur les bactéries gram positives que sur les bactéries gram négatives.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et de *Thymus fontanesii* sont de bonnes qualités et se caractérisent par des activités biologiques qui leur permettent d'avoir un effet fort sur les cellules bactériennes gram négatif et gram positif. De ce fait, elles seront utiles sur de nombreuses maladies.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

### A

- A.D. Azaz et al. Composition and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of some Thymus species. Z. Naturforsch. (2004).
- AFNOR (1986). Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p.
- AFNOR (Association Française de Normalisation), Recueil des Normes Françaises : Huiles Essentielles, Edition AFNOR, 2000.
- AFNOR. Association Française de Normalisation « huiles essentielles ». Recueil des normes française (Huiles essentielles) AFNOR NF T 75-006, (2000).
- AFNOR. Huiles essentielles - règles générales d'étiquetage et de marquage des récipients - NF T75-002. Association française de normalisation ; 1996.
- Aberchane M., Fechtal M., Chaouch A., Bouayoune T. Influence de la durée et de la technique d'extraction sur le rendement et la qualité des huiles essentielles du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* Manetti). Annales de la recherche forestière au Maroc ISSN 0483-8009 CODEN AFRMA. : 2001, 34, 110- 118.
- Arab K., Bouchenak O., Yahiaoui K. (2014). Etude physico chimique et évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Sarriette des montagnes vis à vis des bactéries isolées des infections urinaires. Revue Agriculture, 7, 12-19.
- Aref et Heddad ,(2015). Contribution à l'étude photochimique ,les activités biologiques (antioxydant et antibactérienne) d'une plante médicinale, *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf ) mémoire de master, université Hamma Lakdar El oued, p78.

### B

- BADIAGA M. 2011 - Étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* (Smith). Une plante médicinale africaine récoltée au Mali, Thèse de Doctorat, Université de Bamako, 137 p.
- Bekhechi, C, Bekkara, F.A., Abdelouahid, D.E., Tomi, F., & Casanova, J. (2007), composition and Antibacterial Activity of the Essential oil of *Thymus fontanesii* Boiss, et Reut from Algeria. Journal of Essential Oil Research, 19(6), 594-596.
- Bentichou, (1999), Extraction et caractérisation et analyse de l'huile essentielle de thym d'Algérie par chromatographie en phase gazeuse (CPG), thèse d'ingénieur, univ, Média.

- Bousbia,N,(2011), Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et co-produits agroalimentaires, Thèse en cotutelle présentée pour obtenir de garde de docteur en sciences. Université D'Avignon et des pays de Vaucluse & école nationale supérieure agronomique El Harrach-Alger : 26.
- Brian M,L (1995). The isolation of aromatic materials from plants product,R,J,Reynolds Tobacco Company ,Winston-Salem(USA),p 57-148.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

### C

- Carré P.(1953) :précis de technologie et de chimie industrielle .Tome3.,Ed.Ballière J.B. et fils, France, Paris ,In :Bekhchi(2002) :analyse d'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* (nunkha)de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien ,Thèse de magister ,Université de Tlemcen.

### D

- De Cliff, S., &Harerimana, P. C. (2013). Extraction de l'Huile Essentielle Complète des Fleurs de *Cananga Odorata* de la Plaine de l'Imbo: Vers la Vulgarisation d'une Nouvelle Filière de Plante Industrielle au Burundi. *Revue de l'Université du Burundi-Série Sciences Exactes N° 28, S-De.*

### E

- Edeoga, H.O., Okwu, D.E. and Mbaebie, B.O. (2005) Phytochemical Constituents of Some Nigerian Medicinal Plants. *African Journal of Biotechnology*, 4, 685-688. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2005.000-3127>.
- El amri et al. *J. Appl. Biosci.* (2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées *Journal of Applied Biosciences* 82:7481– 7492 ISSN 1997–5902.
- Elgamouz, S., BOUZEKRI, O., BOUYMAJANE, A., & RHAZI, F. (2020). The Study of Antioxidant and Antimicrobial activities of Moroccan *Thymus vulgaris*' Essential oil and its Physicochemical Characteristics in comparison with previous Studies. *RHAZES: Green and Applied Chemistry*, 10, 103-12.
- Eloff JN (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64: 711–3.

## F

- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Salgueiro, L., Miguel, M. G., & Faleiro, M. L. (2008). Portuguese Thymbra and Thymus species volatiles: chemical composition and biological activities. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3120-3140.
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., & Narbad, A. (2003). Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 113-122.

## G

- Giweli A.A., Dzamic A .M., Sokovic M . D., Ristic M.S., Marin P.D. 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Thymus algeriensis* wild-growing in Libya . *biology* 8(5) : 504-511.

## H

- H. Amiri Essential oils composition and antioxidant properties of three *Thymus* species *Evid. Based Complement Alternat. Med.*(2012).
- Haddouchi F., Lazouni H.A., Meziane A., Benmansour A. 2009. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut . *Science* 05(2) : 246-259.
- [https://www.hifamilies.fr/famille-nombreuse/aromatherapie\\_huiles\\_essentielles](https://www.hifamilies.fr/famille-nombreuse/aromatherapie_huiles_essentielles)

## J

- Jean-Christophe Létard, Jean-Marc Canard, Vianna Costil, Pierre Dalbiès, Bernard Grunberg, Jean Lapuelle, Commissions nutrition et thérapies complémentaires du CREGG Dans *Hegel* 2015/1 (N° 1), pages 29 à 35.

## K

- Kacimi Elhassani, M. (2012). Caractéristique chimique évolution des propriétés antimicrobienne et antifongique « in vitro » des huiles essentielles de *thymus fontanesii* Boiss et Reut , et de *Zyziphorahispanica* L., de la région de Djelfa ( Doctoral dissertation جامعة الجلفة ).

- Kaloustian, J., Abou, L., Mikail, C., Amiot, M. J., & Portugal, H. (2005). Southern French thyme oils: chromatographic study of chemotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(14), 2437-2444.
- Karaman, Sengul, and Yusuf ZiyaKocabas. "Traditional medicinal plants of K. Maras (Turkey)." *The Sciences* 1.3 (2001): 125-128.
- Kim, S. I., Park, C., Ohh, M. H., Cho, H. C., & Ahn, Y. J. (2003). Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae). *Journal of Stored Products Research*, 39(1), 11-19.

### L

- L. Harkat-Madouri et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria *Ind. Crops Prod.* (2015)
- Lalami, A. E. O., Fouad, E. A., Ouedrhiri, W., Chahdi, F. O., Guemmouh, R., & Greche, H. (2013). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain: *Thymus vulagris* et *Thymus satureioidis*. *Les technologies de laboratoire*, 8(31).
- Lucchesi, M, E, F, Chemat, and J, Smadja, (2004), solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs; comparison with conventional hydro-distillation, *Journal of Chromatography for the Extraction Oil*, A, 1043(2); p323-327.

### M

- Mahboub, N., Slimani, N., Nadji, S. B., Bouzeguag, C., Kadri, M., & Khelil, A. (2019). Extraction et caractérisation physico-chimique et biologique des huiles essentielles à partir de *Cymbopogon schoenanthus* DANS LA REGION DE GHARDAÏA. *Revue des bio ressources*, 9(2), 14-14.
- Mebarki, N. (2010). Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne (Doctoral dissertation, Boumerdès).
- Mith, H., Dure, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food science & nutrition*, 2(4), 403-416.

- Moriera M ,R.,Ponce A,G., de Valle C,E &Roura S,I.,2005- Inhibitory paramerts of essential oils to reduce a food borne pathogen.Lebensmittel.Wissenschaft und – Technologie-LWT,38 ;565-570.
- M'hamedMerdji, Djamel Guemache . Les plantes aromatiques et médicinales: Une filière à renforcer <https://ecotimesdz.com/les-plantes-aromatiques-et-medicinales-une-filiere-a-renforcer/> 11 février 2023.

## N

- Najar B, Pistelli L, Ferri B, Angelini LG, Tavarini S. Crop Yield and Essential Oil Composition of Two *Thymus vulgaris* Chemotypes along Three Years of Organic Cultivation in a Hilly Area of Central Italy. *Molecules*. 2021 Aug 23;26(16):5109. doi: 10.3390/molecules26165109. PMID: 34443694; PMCID: PMC8398316
- Nasir, M., Tafess, K., & Abate, D. (2015). Antimicrobial potential of the Ethiopian *Thymus schimperi* essential oil in comparison with others against certain fungal and bacterial species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-5.
- Niculae, M. I. H. A. E. L. A., Spînu, M. A. R. I. N. A., Şandru, C. D., Brudaşcă, F., Cadar, D., Szakacs, B. I. A. N. C. A., ... & Mateş, C. I. (2009). Antimicrobial potential of some Lamiaceae essential oils against animal multiresistant bacteria. *Lucrări Ştiinţifice Medicină Veterinară Timoara*, 42, 170-175.
- Niculae, M., Spînu, M., Şandru, D., Brudaşcă, F., Cadar, D., Kobolkuti, L., ... & Kiss, T. (2009). Lamiaceae essential oils and alcoholic extracts and their effects on zoonotic multi rug-resistant bacteria. *Planta Medica*, 75(09), PJ86.

## O

- Oladipupo A. Lawal, Isiaka A. Ogunwande, Essential Oils from the Medicinal Plants of Africa. in *Medicinal Plant Research in Africa*, (2013) Pharmacology and Chemistry, Pages 203-224 .
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food control*, 18(5), 414-420.

## P

- Ponce A,G.,Fritz R.,Juliano C,E.&Roura S,I., 2003 – Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of organic Swiss chard ,*Lebensmittel – Wissenschaft und – Technologie* ,36;679-684.

## R

- Rached, S., Imatara, H., Habsaoui, A., Mzioud, K., Haida, S., Saleh, A., ... & El Fartah, S. (2022). Characterization, Chemical Compounds and Biological Activities of *Marrubium vulgare* L. Essential Oil. *Processes*, 10(10), 2110.

## S

- S. Fellah, M. Romdhane, M. Abderraba. Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis* L. cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *J. Soc. Alger. Chim* (2006), 16(2), 193-202.
- Sadgrove, N.J., & Jones, G.L. (2015). A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. *Agriculture*, 5, 1-55.
- Safaei-Ghomi, J., Ebrahimabadi, A.H., Djafari-Bidgoli, Z. and Batooli, H. (2009) GC/MS Analysis and in Vitro Antioxidant Activity of Essential Oil and Methanol Extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and Its Main Constituent Carvacrol. *Food Chemistry*, 115, 1524-1528. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.051>.
- Sahin F, Gulluce M, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Agar G, Ozer H 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* 15: 549-557.
- Schnitzler, P., Koch, C., & Reichling, J. (2007). Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(5), 1859-1862.
- Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K, et al. (2001) Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E. coli* O157: H7. *Ital J Food Sci* 13: 65–75.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Chafer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*, 3, 1-16.

## T

- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9), 1199-1218.
- Thosar, N., Basak, S., Bahadure, R. N., & Rajurkar, M. (2013). Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An in vitro study. *European journal of dentistry*, 7(S 01), S071-S077.

- Touhami, F., Bazairi, H., Badaoui, B., Bouarour, B., & Benhoussa, A. (2017). MerjaZerga lagoon: study of the functional structure and bioassessment of the ecological quality of benthic communities.

#### V

- Viljoen A, Van Vuuren S, Ernst E, Klepser M, Demirci B, Baser H, Van Wyk BE 2003. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae). The antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *J Ethopharmacol* 88: 137-143.

#### W

- Wolff JP. 1968. *Manuel d'analyse des corps Gras*. Paris-Azoulay, 115p.

#### Z

- Zaika L, L., 1988, spices and herbs-their Antimicrobial activity and its Determination. *Journal of Food safety*, 9. 97-118.

# **ANNEXES**

## **Annexes 1 : Préparation des milieux de culture utilisés**

- **Muller Hinton**

38g de poudre et la mélanger dans 1L d'eau distillée

- **Gélose nutritive**

28,0 grammes dans 1 litre d'eau distillé

- **Chapman**

111 grammes de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée stérile

- **Gélose céramide**

45,3 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée