



# 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  
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

GUEMAIR Aicha.

HADDOU El hadja Oumelnoune.

Thème

Activité antibiofilm de l'extrait aqueux et éthanolique de *Thymus vulgaris L.*

Soutenu publiquement le 01/07/2024

Jury :

Grade

Président : M<sup>r</sup> SAIM Mohamed Saïd

M.C.A

Université de TIARET

Encadrant : M<sup>r</sup> AGGAD Hebib

Pr

Université de TIARET

Co-encadrant : M<sup>me</sup> BOUTELDJA Rachida

M.A.B

Université de TIARET

Examineur : Mr AYAD Mohamed Amine

M.C.A

Université de TIARET

Année universitaire 2023-2024

## Remerciements

الحمد لله السميع العليم ذي العزة والفضل العظيم الذي بارك لنا في إتمام هذا العمل.

*Au début, nous souhaitons adresser nos remerciements ALLAH, de nous avoir donné la force, la santé, le courage, l'espoir et la volonté pour élaborer le présent travail.*

*Avant de commencer nous profitons l'occasion pour remercier au fond du cœur à notre professeur et promoteur monsieur **AGGAD Hebib** le directeur de laboratoire d'Hygiène et de Pathologie Animale, Institut des Sciences Vétérinaires "Université Ibn Khaldoun - Tiaret», c'est que de la fierté d'être notre encadrant , pour ses conseils, ses efforts, son aide, et leur attention durant toute la période de travail.*

*Nous tenons à adresser nous chaleureux remerciement à notre Co-promotrice docteur **BOUTELDJA Rachida** pour leur disponibilité tout au long de cette expérience, leur soutien, leur gentillesse leur ouverture d'esprit, et sa patience qui joue un rôle très important dans la réalisation de ce projet.*

*Nous exprimons nos remerciement les plus s'insère aux membres de jury monsieur **AYAD Mohamed Amine** Et monsieur **SAIM Mohamed Saïd** d'avoir accepté d'examiner, d'évaluer et de juger notre mémoire.*

*Nos profonds remerciements à toute l'équipe de formation du Master académique en Microbiologie Appliquée Université Ibn Khaldoun Tiaret. Et surtout un grand et sincère remerciement à Monsieur **HOCINE Laredj** le chef de spécialité de Master Microbiologie appliquée.*

*Nos remerciements à toute l'équipe de laboratoire*

*d'Hygiène et de Pathologie Animale, Institut des Sciences Vétérinaires "Université Ibn Khaldoun - Tiaret- Et surtout madame **BENHAMMOUDA Leïla Soher** et monsieur **DOUCENE Radhouane**, les ingénieurs de ce laboratoire pour leurs aides et leurs disponibilités pendant la durée de travail.*

*Nous remercions aussi madame **BABADJI Khadidja** et mademoiselle **ABBDI Fatima Zohra** pour leurs conseils et pour eu avoir la patience et de répondre à nos questions .*

*Enfin, nous remercions toutes personnes qui nous ont apporté leurs aides et qui ont contribué de près ou de loin dans la création de notre travail.*

## *Dédicaces*

*Du profond de mon cœur, Je dédie ce travail...*

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir : Ma adorable mère BELMOSTEFA KHEIRA, ma raison d'être, ma raison de vivre, Ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés le fruit de vos innombrables sacrifices. Que dieu vous donne le bonheur et la longue vie.*

*A l'homme mon précieux offre au dieu, qui doit ma vie, ma réussite : Mon chère père GUEMAIR SAHRAOU, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, car tu as toujours cru en moi, je suis que je suis maintenant, merci infiniment papa.*

*A ma adorable petite sœur NADA, ma plus belle, j'aurai tant aimé partager la joie de ma réussite avec toi, Merci de m'avoir accompagnée et de m'avoir encouragée et merci pour votre soutien moral.*

*A mes chères frères KARIM et ABDELLAH, En témoignage de l'amour que je porte pour vous, je vous dédie cet réussite.*

*A ma deuxième mère, AIBOUT BAKHTA, merci pour votre soutien plus que précieux dans tous les moments.*

*A ma deuxième sœur, et ma meilleure binômes dans le monde : HADDOU ELHADJA OUME ELNOUNE, qui j'aime trop, je partagé avec elle les joies et les difficultés au cours de cette expérience j'ai l'honneur de travailler avec toi. Que dieu te protège.*

*A ma chère cousine ARABAT Mokhtaria.*

*A toute ma famille, qui représente une source d'espoirs et de motivation.*

*A mes chères copines et chères sœurs : MANEL, MANOCHA, SARA, MELISSA, HOUAIDA, NARIMANE, KHALDIA, CHAHINEZ, qui ont partagé toutes les bons et les mauvais moments avec moi.*

**GUEMAIR AICHA**

## *Dédicaces*

*Du profond de mon cœur, Je dédie ce mémoire ...*

*A la chose la plus précieuse que j'ai, qui m'a donné la vie, ma chère mère **AIBOUT Bakhta**, Symbole de tendresse et de sacrifice. C'est auprès de vous que j'ai appris la patience et à ne pas échouer. Tu t'es couchée tard, tu as travaillé et tu as défié le monde pour moi. Ta présence à mon cotés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles. Alors c'est notre succès et le fruit de notre travail depuis des années. Que Dieux te garde pour moi.*

*A l'homme mon précieux offre du dieu, ma réussite : Mon chère père **HADDOU Benaïssa**, qui a été et sera toujours un exemple pour moi par ses qualités humaines et sa responsabilité, je suis très reconnaissante et j'aurai tant aimé partager la joie de ma réussite avec lui.*

*A ma deuxième mère, **TENNAH Zahra**, ma chère grande mère, je lui dédie avec fierté ce mémoire qui reflète le fruit de l'attention qu'il m'a tant réservé qui ma supportée et m'a aidée dans les pires moments, Que Dieux te garde pour nous.*

*A mon très cher oncle **TENNAH Bachir** et ses filles et fils **Zahira, Aïcha et Rahima, Rabah, Maarouf, Djamelet Mohamed.***

*A ma deuxième sœur, et ma meilleure binômes dans le monde :*

***GUEMEIR Aïcha**, qui je partage avec toi cet réussite, Cela n'a pas été facile, mais nous l'avons fait. Merci ma chère d'être avec moi vraiment c'est une très belle expérience qui j'ai la partagée avec toi*

*A mon très cher oncle **TENNAH Maarouf** (Que dieu aie son âme).*

*A mes chères cousines, **LARABI Racha** et **SEBAA Kaouthar** qui ont partagé toutes les bons et les mauvais moments avec moi.*

*A mes chères copines et chères sœurs : **SOUHOLA, NADA, AHLLEM, MANEL, HOUAIDA, NARIMANE, KHALDJA, CHAHINEZ**, qui ont partagé toutes les bons et les mauvais moments avec moi.*

**HADDOU ELHADJA OUME ELNOUNE**

## Résumé

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'Antiquité comme remèdes à de nombreuses maladies affectant la santé humaine grâce à leurs richesses en molécules actives.

Le but de la présente étude était d'étudier la capacité antioxydante de deux extraits de *Thymus vulgaris* par la méthode DPPH, et d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits de *T. vulgaris* contre deux souches de *S. aureus*, l'une isolée et l'autre référencée, et d'estimer leur capacité à prévenir et à éradiquer le biofilm produit par ces souches.

D'après nos résultats, le rendement d'extraction de l'extrait aqueux était de 10,03 % et de 14.66 % pour l'extrait éthanolique (80%).

Le criblage phytochimique a montré que les extraits éthanoliques et aqueux contenaient des flavonoïdes, des terpénoïdes, des glycosides cardiaques, des mucilages et des alcaloïdes.

L'extrait éthanolique a montré une quantité de polyphénols et de flavonoïdes de  $14,61 \pm 2,17$  mg EAG/g et  $13,08 \pm 0,02$  mg EAG/g respectivement tandis que l'extrait aqueux a montré une teneur totale en polyphénols de  $8,427 \pm 0,82$  mg EAG/g et de  $3,35 \pm 0,02$  mg EAG/g pour les flavonoïdes. En ce qui concerne l'activité antioxydante, l'extrait aqueux a inhibé 50 % des radicaux libres à une concentration de 0,01 mg/ml et 0,10 mg/ml pour l'extrait éthanolique.

L'activité antibactérienne de l'extrait éthanol (80 %) contre les bactéries *S.aureus* isolées I et référencées R a donné des résultats positifs de 13,01 et 12,64 mm de zone d'inhibition.

De plus, l'activité antibiofilm a montré une grande capacité de l'extrait éthanolique à 80% à inhiber la formation de biofilms par les souches I et R de *S.aureus* avec des pourcentages très élevés variant entre 78,14% et 99,55%. De même, cet extrait possède un haut pouvoir de destruction du biofilm formé par ces mêmes souches avec des pourcentages atteignant 94.29% et 95.19%. Alors que l'extrait aqueux possédait des pourcentages assez faibles de 47 à 51%.

**Les mots clés :** *Thymus vulgaris*, composés bioactives, *S. aureus* R et I, antioxydante, antibactérienne, antibiofilm.

## Abstract

Medicinal plants have been used since Antiquity as remedies for many illnesses affecting human health, thanks to their rich active molecules.

The present study aimed to investigate the antioxidant capacity of the two *Thymus vulgaris* extracts by the DPPH method, and to evaluate the antibacterial activity of *T. vulgaris* extracts against two *S. aureus* strains, one isolated and the other referenced, and to estimate their ability to prevent and eradicate the biofilm produced by these strains.

According to our results, the extraction yield of the aqueous extract was 10.03% and 14.66% for the ethanolic extract (80%).

Phytochemical screening showed that both ethanolic and aqueous extracts contained flavonoids, terpenoids, cardiac glycosides, mucilages and alkaloids.

The ethanolic extract showed a polyphenol and flavonoid content of  $14.61 \pm 2.17$  mg EAG/g and  $13.08 \pm 0.02$  mg EAG/g respectively, while the aqueous extract showed a total polyphenol content of  $8.427 \pm 0.82$  mg EAG/g and  $3.35 \pm 0.02$  mg EAG/g for the flavonoid content. With regard to antioxidant activity, the aqueous extract inhibited 50% of free radicals at a concentration of 0.01 mg/ml and 0.10 mg/ml for the ethanolic extract.

The antibacterial potency activity of the ethanol extract (80%) showed strong inhibition against isolated I and referenced R *S. aureus* bacteria, with results of  $13.01 \pm 0.12$  SD and 12.64 mm zone of inhibition.

Furthermore, the antibiofilm activity showed a high capacity of the 80% ethanolic extract to inhibit the formation of biofilms formed by IS and R strains of *S. aureus* with very high percentages of up to 99.55%; and 78.14% respectively. Similarly, this extract has a high capacity to destroy the biofilm formed by the same bacterial strains, with percentages reaching 94.29%; and 95.19%; . The aqueous extract, on the other hand, had low percentages, ranging from 47 to 51%.

**Key words:** *Thymus vulgaris*, bioactive compounds, *S. aureus* R and I, antioxidant, antibacterial, antibiofilm.

## المخلص

استُخدمت النباتات الطبية منذ العصور القديمة كعلاجات للعديد من الأمراض التي تؤثر على صحة الإنسان، وذلك بفضل جزيئاتها النشطة الغنية.

هدفت هذه الدراسة إلى فحص القدرة المضادة للأكسدة لمستخلصي *Thymus vulgaris* بطريقة DPPH، وتقييم النشاط المضاد للبكتيريا لهذه المستخلصات ضد سلالتين من بكتيريا *S.aureus*، إحداهما معزولة والأخرى مرجعية، وتقدير قدرتها على منع واستئصال الأغشية الحيوية التي تنتجها هذه السلالات.

ووفقاً للنتائج التي توصلنا إليها، بلغ ناتج الاستخلاص من المستخلص المائي 10.03% و 14.66% للمستخلص الإيثانولي (80%).

وأظهر الفحص الكيميائي النباتي أن كلا المستخلصين الإيثانولي والمائي يحتويان على مركبات الفلافونويد والتربينويدات والجليكوسيدات القلبية والصمغيات والقلويات.

أظهر المستخلص الإيثانولي محتوى من البوليفينول والفلافونويد يبلغ  $2.17 \pm 14.61$  ملجم فلافونويد/غرام و  $0.02 \pm 13.08$  ملجم فلافونويد/غرام على التوالي، بينما أظهر المستخلص المائي محتوى إجمالي من البوليفينول يبلغ  $0.82 \pm 8.427$  ملجم فلافونويد/غرام و  $0.02 \pm 3.35$  ملجم فلافونويد/غرام لمحتوى الفلافونويد. أما فيما يتعلق بالنشاط المضاد للأكسدة، فقد قام المستخلص المائي بتثبيط 50% من الجذور الحرة بتركيز 0.01 ملجم/مل و 0.10 ملجم/مل للمستخلص الإيثانولي.

أظهر النشاط الفعال المضاد للبكتيريا لمستخلص الإيثانول (80%) تثبيطاً قوياً ضد بكتيريا *S.aureus* المعزولة والمشار إليها، حيث بلغت نتائج التثبيط 13.01 و 12.64 ملم .

علاوة على ذلك، أظهر النشاط المضاد للأغشية الحيوية الرقيقة قدرة عالية للمستخلص الإيثانولي بنسبة 80% على تثبيط تكوين الأغشية الحيوية الرقيقة التي تكونت من سلالات بكتيريا *S.aureus* I و R بنسب عالية تراوحت بين 99.29%؛ و 78.14%. وبالمثل، يتمتع هذا المستخلص بقدرة عالية على تدمير الغشاء الحيوي الرقيق الذي شكلته نفس السلالات البكتيرية، حيث وصلت النسب إلى 94.29% و 93.19%. من ناحية أخرى، كان المستخلص المائي يحتوي على نسب منخفضة تتراوح بين 47 و 51%.

**الكلمات الرئيسية:** *Thymus vulgaris*، مركبات نشطة بيولوجياً، بكتيريا *S. aureus* R و I، مضادات الأكسدة، مضاد للبكتيريا، مضاد الغشاء البيولوجي.

## Liste des Abréviations

- **ADN** : Acide **d**ésoxyribonucléique.
- **AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'**a**luminium.
- **ATCC** : American Type Culture Collection.
- **C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>** : Acétate de sodium
- **CHCl<sub>3</sub>** : **C**hloroforme.
- **DPPH** : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>).
- **EAG** : Equivalent Acide **G**allique.
- **EPS** : Exopolysaccharides.
- **EQ** : Equivalent **Q**uercétine.
- **Ex Aq** : **E**xtrait **A**queux.
- **Ex Et** : **E**xtrait **E**thanolique
- **FeCl<sub>3</sub>** : **c**hlorure ferrique.
- **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique.
- **IC<sub>50</sub>** : Concentration **i**nhibitrice médiane.
- **MH**: **M**uller **H**inton.
- **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium.
- **NH<sub>4</sub>OH** : **A**mmoniaque.
- **OH** : Radical **h**ydroxyle.
- **SI** : *Staphylococcus aureus* **I**solée.
- **SR** : *Staphylococcus aureus* **R**éférencée.
- **RCA** :**R**ouge**C**ongo**A**gar.



## Liste de Figures

<b>Figure N°01</b> : Aspect morphologique de <i>Thymus vulgaris</i> .	5
<b>Figure N°02</b> : Différents étapes de formation de biofilm bactérien	8
<b>Figure N°03</b> : Poudre fine de <i>Thymus vulgaris</i> .	13
<b>Figure N°04</b> : Organigramme des étapes de préparation des extraits.	14
<b>Figure N° 05</b> : Digramme représentatif d'activité antibactérienne	19
<b>Figure N°06</b> : Diagramme des étapes de l'activité anti-biofilm	22
<b>Figure N°07</b> : Pourcentage de rendement d'extraction des extrait aqueux et hydroéthanolique 80% de <i>Thymus vulgaris</i>	25
<b>Figure N°08</b> : Le taux de polyphénols totaux des extraits aqueux et hydroéthanoliques (80%) de <i>T. vulgaris</i>	28
<b>Figure N°09</b> : Dosage des flavonoïdes des extraits aqueux et éthanoliques (80%) de <i>T. vulgaris</i>	30
<b>Figure N°10</b> : IC50 (mg/ml) d'A.ascorbique, Extrait éthanolique et aqueux de <i>T. vulgaris</i>	31
<b>Figure N°11</b> : Zones d'inhibition d'extrait éthanolique (mm) <i>T. vulgaris</i> . <b>A)</b> : <i>S.aureus</i> I ; <b>B)</b> : <i>S.aureus</i> R.	33
<b>Figure N° 12</b> : Activité antibactérienne d'extrait éthanolique <i>T. vulgaris</i> .	33
<b>Figure N° 13</b> : Phénotype de la production de biofilm sur RCA	35
<b>Figure N° 14</b> : Traitement par le Cristal Violet.	36
<b>Figure N° 15</b> : Pourcentage d'inhibition de formation de biofilm par l'extrait éthanolique de <i>T.vulgaris</i> .	37
<b>Figure N° 16</b> :Pourcentage d'inhibition de formation de biofilm par les deux extraits de <i>T.vulgaris</i>	37
<b>Figure N° 17</b> : : Destruction de biofilm par l'extrait éthanolique de <i>T.vulgaris</i>	39

**Figure N° 18:**Destruction de biofilm par l'extrait aqueux de *T.vulgaris*. .....39

## Liste de Tableaux

<b>Tableau N°01</b> : Classification taxonomique de <i>Thymus vulgaris</i> . .....	6
<b>Tableau N° 02</b> : Liste des matériels utilisés durant l'expérience. ....	12
<b>Tableau N°03</b> :Screening phytochimiques des extraits aqueux et hydro-éthanoliques de <i>T.vulgaris</i> .....	26

## **Listes des Annexes**

<b>Annexe I</b> : Préparation des extraits .....	56
<b>Annexe II</b> : Analyses Phytochimiques.....	58
<b>Annexe III</b> : Les Courbes D'étalonnages.....	60
<b>Annexe IV</b> : Activité antioxydante.....	61
<b>Annexe V</b> : Activité Antibactérienne .....	62
<b>Annexe VI</b> : Techniques utilisées.....	63
<b>Annexe VII</b> : Activité antibiofilm des extraits.....	64
<b>Annexe VIII</b> : Composition de milieux de cultures.....	65

## *Table des matières*

Remerciements.....	
Dédicaces .....	
Dédicaces .....	
Résumé .....	
Liste des Abréviations .....	
Liste de Figures.....	
Liste de Tableaux.....	
Listes des Annexes .....	
Introduction .....	2

### **Partie I Etude Bibliographique**

#### **I. *Thymus vulgaris***

I.1. Description de <i>Thymus vulgaris</i> .....	5
I .1.1. Classification taxonomique .....	5
I .1.2 Propriétés biologiques du <i>Thymus vulgaris</i> .....	6

#### **II. Activité antibiofilm**

I .2.1 Définition .....	7
I .2.2 Cycle de formation de biofilm .....	7
I .2.3 Caractéristiques des bactéries vivantes dans un biofilm.....	8
I .2.4 Les plantes médicinales et la lutte contre le biofilm.....	8

### **Partie II Matériel et Méthodes**

II .1 Objectifs de travail .....	11
II .2 Lieu de travail.....	11
II .3.1 Matériels utilisés : .....	12
II .3.2 Matériel végétal.....	13
II.4 Analyses phytochimiques .....	13
II.4.1 Préparation des extraits .....	13

II.4.2 Rendement des extraits .....	15
II.4.3. Screening phytochimique.....	15
II.4.4 Dosages des polyphénols totaux.....	16
II.4.5 Dosage des flavonoïdes .....	17
II.2.Analyses biologiques.....	17
II.2.1. Activité antioxydante .....	17
II.2.2. Activité antibactérienne .....	18
II.2.3 Evaluation de l'activité antibiofilm .....	20
II.2.3.1.Évaluation de la capacité des souches à former un biofilm.....	20
II.2.3.1.1. Technique de Rouge Congo .....	20
II.2.3.2. Activité antibiofilm.....	21
II.2.3.2.1.Inhibition de la formation de biofilm après 5j.....	21
II.2.3.4.2.Destruction de biofilm après 5jours de production.....	21
Analyses statistiques.....	23

### **Partie III.Résultats et Discussion**

III.1.Analyse phytochimiques .....	25
III.1.1Rendement d'extraction .....	25
III.1.2. Screening phytochimique.....	26
III.1.3. Dosage des polyphénols totaux .....	28
III.1.4.Dosage flavonoïdes.....	30
III.2.1. Analyses biologiques.....	31
III.2.2.Activité antibactérienne.....	33
III.2.3 Evaluation de l'activité antibiofilm.....	35
III.2.3.1.1. Technique de Rouge Congo .....	35
III.2.3.2. Activité antibiofilm.....	36
III.2.3.2.1.Inhibition de la formation de biofilm après 5j.....	36

<b>III.2.3.4.2.Destruction de biofilm après 5jours de production.....</b>	<b>38</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>42</b>
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>44</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>56</b>

# *Introduction*



Avec l'augmentation du nombre de maladies causales par les germes pathogènes, la santé publique est actuellement une préoccupation majeure. En effet, la résistance aux antibiotiques d'origine synthétique est considérée comme un problème majeur de santé publique au niveau mondial, en raison de la perte de leur efficacité (Alkufeidy et al., 2022).

Ceci incite à la recherche d'une nouvelle approche thérapeutique alternative plus fiable avec moins d'effets secondaires que les médicaments conventionnels (Quresh et al., 2022).

Le biofilm est considéré comme un mode de vie très courant dans le monde bactérien, ainsi qu'une communauté microbienne construite par des micro-organismes qui adhèrent à une surface et sont intégrés dans une matrice extracellulaire qu'ils produisent. On les trouve dans une grande variété d'environnements, tant naturels qu'artificiels (Sauer et al., 2022 ; Yannick et al., 2014).

L'assemblage de micro-organismes sur une surface leur permet de développer une résistance aux antibiotiques (Muzamil et al., 2021). En outre, Le développement de biofilms est l'un des principaux facteurs de la plupart des infections humaines. De plus, les biofilms sont à l'origine d'un grand nombre d'infections. Alors que 80 % des infections microbiennes sont causées par des microorganismes dans des biofilms (Jamal et al., 2018).

Depuis l'antiquité, les plantes médicinales ont été utilisées par l'homme pour traiter et guérir toutes sortes de maladies, grâce à leurs propriétés thérapeutiques basées sur un vaste réservoir de substances attribuées aux métabolites secondaires qui possèdent de multiples activités biologiques (Zeghad.2009).

Le choix de la plante pour cette étude s'est porté sur le thym, grâce à son utilisation dans la médecine traditionnelle de la région de Tiaret « Algérie ».

*Thymus vulgaris* est une plante médicinale dotée d'un large éventail de propriétés biologiques grâce à sa richesse en composés bioactifs, notamment des terpénoïdes, des flavonoïdes et des composés phénoliques (Babotă et al., 2023 ; Miller et al., 2006).

On considère que les plantes médicinales sont peu coûteuses et qu'elles constituent un substitut efficace dans la lutte contre les agents pathogènes résistants aux agents antimicrobiens (**Majeed et al., 2019**). Le potentiel biologique des substances bioactives d'origine naturelle peut être exploité pour traiter un large éventail des problèmes de la santé humaine (**Wijesundara et al., 2019**).

La présente étude vise à évaluer la richesse des extraits éthanoliques (80%) et aqueux de *T. vulgaris* en composés bioactifs, y compris le dépistage phytochimique, les dosages de polyphénols et de flavonoïdes, l'activité antioxydante et la puissance antibactérienne contre *S. aureus* isolé et référencé, ainsi que leur capacité à inhiber la formation et la destruction du biofilm produit par les souches testées. Ces résultats renforcent l'utilisation de ces extraits de plantes médicinales comme alternative aux antibiotiques.

*Partie I.*

*Etude*

*Bibliographique*

## I. *Thymus vulgaris*

### I.1. Description de *Thymus vulgaris*

*Thymus vulgaris* fait partie de la famille des lamiacées (labiées), c'est l'une des familles les plus grandes dans le règne végétal (Naghibi et al., 2005).

*Thymus vulgaris* est un arbuste aromatique vivace atteignant une hauteur de 20 à 30 cm (Jamali et al., 2012) (Figure N°01). Il a des racines épaisses et des branches fines, denses et ramifiées. Ces tiges sont dressées, ramifiées, ligneuses et blanchâtres avec une base incurvée, et les feuilles sont en forme d'aiguille, opposées, persistantes, vert grisâtre, linéaires, de 0,5 à 3 mm de large et de 3 à 12 mm de long. Les fleurs sont petites (4 à 6 mm de long), blanches à roses, symétriques, divisées en 2 ou 3 à l'aisselle des feuilles et groupées en glomérules ovales (Singh. 2007).

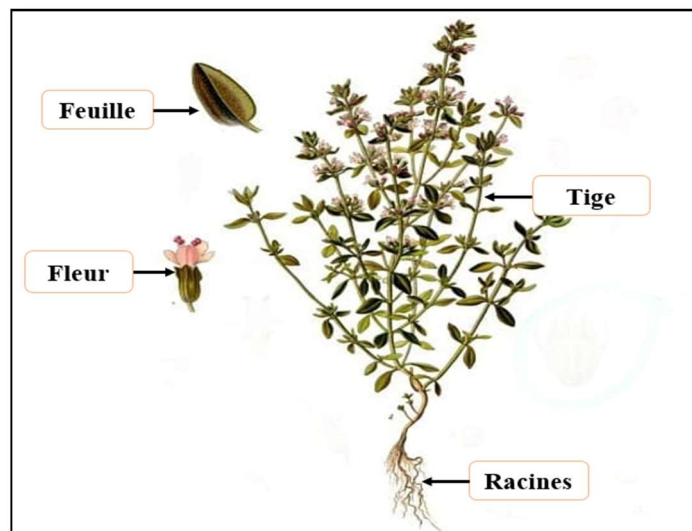


Figure N°01 : Aspect morphologique de *Thymus vulgaris*.

#### I.1.1. Classification taxonomique

La répartition botanique de *Thymus vulgaris* est présentée dans le tableau N°01

**Tableau 1 : Classification taxonomique de *Thymus vulgaris* (Goetz et Ghédira.,2012).**

<b>Règne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Ordre</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Famille</b>	<i>Lamiaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Thymus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Tymus vulgaris</i>

### **I .1.2 Propriétés biologiques du *Thymus vulgaris***

*Thymus vulgaris* se caractérise par sa forte teneur en substances biactives, qui contribuent à ses nombreuses vertus biologiques, notamment ses activités antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, antivirales et antiinflammatoires (Bukvicki et al., 2018). (Yakhlef et al., 2011), montrent que l'extrait de *Thymus vulgaris* possède une activité antibactérienne contre plusieurs souches bactériennes.

De plus, plusieurs études révèlent une capacité antioxydante liée à sa richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes (Yan et al., 2020).

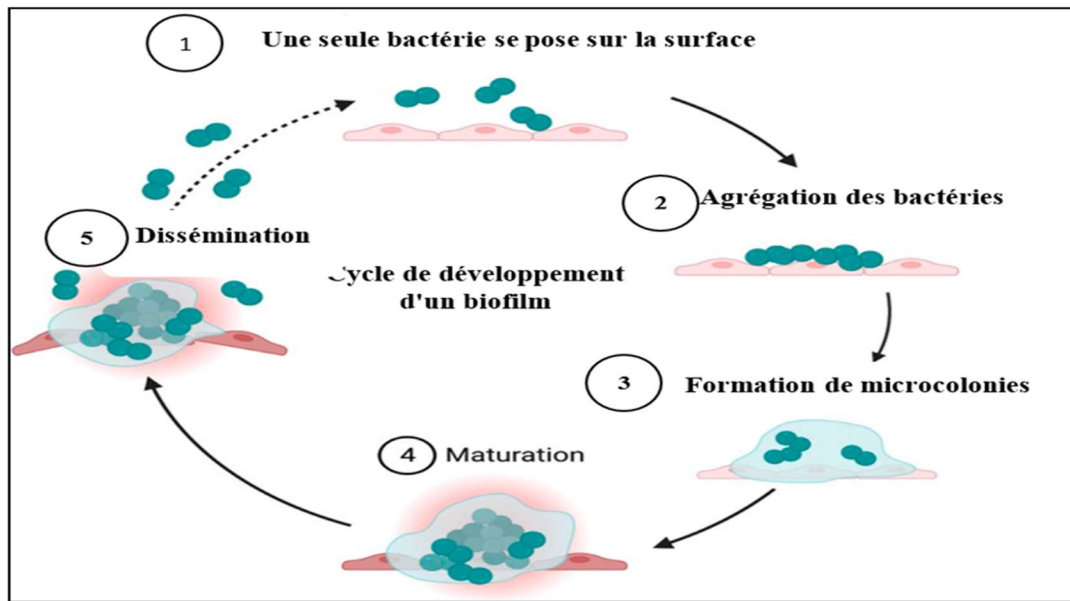
## II. Activité antibiofilm

### I .2.1 Définition

Le biofilm est une structure hétérogène composée de populations bactériennes intégrées dans une matrice extracellulaire autoproduite et attachée à des surfaces naturelles ou artificielles (**Agnès et al., 2006**). Celle-ci est composée d'ADN extracellulaire, d'amyloïdes, de polysaccharides et de protéines d'origine microbienne, et de vésicules membranaires (**Flemming et al., 2023**).

### I .2.2 Cycle de formation de biofilm

Le biofilm bactérien se forme lorsque les bactéries sont soumises à des conditions stressantes telles que le manque de nutriments et d'oxygène (**Tlaro, 2008, Vu et al., 2009**). Cette formation se déroule en plusieurs étapes (**Figure N°02**), dont l'adhésion réversible, où les cellules bactériennes s'attachent à la surface (**Bezoui, 2016**). En effet, l'adhésion irréversible implique la production de molécules telles que les acides teichoïques et mycoliques et les exopolysaccharides (EPS) impliqués dans les contacts cellule-cellule et cellule-surface (**Kolter ,2008 ; Hoiby,2000**). Cette étape est suivie par la formation de micro-colonies, au cours de laquelle la croissance des cellules bactériennes et la production d'EPS permettent la création de micro-colonies qui couvrent une ou toutes les parties de la surface (**Jacobsen et al., 2008**). Les bactéries se multiplient et produisent des polymères extracellulaires, formant une structure tridimensionnelle complexe (**Folkesson et al., 2008**).



**FigureN°02** : Différents étapes de formation de biofilm bactérien (Sharma et *al.*, 2023).

### I.2.3 Caractéristiques des bactéries vivantes dans un biofilm

Les cellules bactériennes en biofilm bénéficient de nombreux avantages. Ce biofilm constitue une forme de protection contre plusieurs facteurs physiologiques, dont les UV, les antibiotiques et autres agents antimicrobiens, en empêchant leur pénétration dans l'organisme (Liu et *al.*, 2023).

Le biofilm constitue donc un environnement idéal pour l'établissement de relations syntrophiques (Aliane et *al.*, 2021).

Cette structure multicellulaire leur permet de résister à des conditions défavorables, d'améliorer leur résistance aux agents antimicrobiens, de promouvoir la coopération entre les cellules et de faciliter l'échange de nutriments, assurant ainsi la protection et la structure de la communauté (Prinzi et *al.*, 2023).

### I.2.4 Les plantes médicinales et la lutte contre le biofilm

Actuellement, l'efficacité des antibiotiques dans la lutte contre les bactéries a progressivement diminué en vue de leur augmentation et de leur utilisation parfois inappropriée, conduisant à la formation de biofilm par de nombreuses souches bactériennes résistantes aux antibiotiques (Obeizi, 2020). Cela incite les chercheurs à trouver des nouvelles approches antimicrobiennes qui pourraient fournir des solutions alternatives dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques par le biais de

l'utilisation de plantes médicinales en raison de leur richesse en composés bioactifs (**Castagna et al., 2022 ; Machiex et al., 2005**).

En effet, les plantes médicinales ont souvent des propriétés antibactériennes pouvant être utilisées dans la lutte contre les biofilms (**Zeineb M et al., 2015**). Conformément à l'OMS (**Organisation mondiale de la santé 2020**), les plantes médicinales sont désormais importantes dans le secteur pharmaceutique et médical, en particulier lorsque les composants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières nécessaires à la synthèse des médicaments ainsi que comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs. Il est donc clair que les antimicrobiens d'origine végétale ont leur place dans l'arsenal des médicaments prescrits par les chercheurs ( **Malczak et al.,2023** ) .



*Partie II.*

*Matériel*

*et*

*Méthodes*

## II .1 Objectifs de travail

✚ Déterminer la teneur en métabolites secondaires des extraits aqueux et hydro-éthanoliques (80%) de la plante *Thymus vulgaris* par le biais d'un criblage phytochimique.

✚ Déterminer la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de *Thymus vulgaris*.

✚ Estimer les propriétés biologiques de *Thymus vulgaris* : activité antioxydante, antibactérienne et antibiofilm " formation et destruction ".

## II .2 Lieu de travail

Ce travail a été effectué au Laboratoire d'Hygiène et Pathologies Animale, Institut des Sciences Vétérinaires "Université Ibn Khaldoun - Tiaret". Durant la période du 01 Février au 01 Mai 2024.

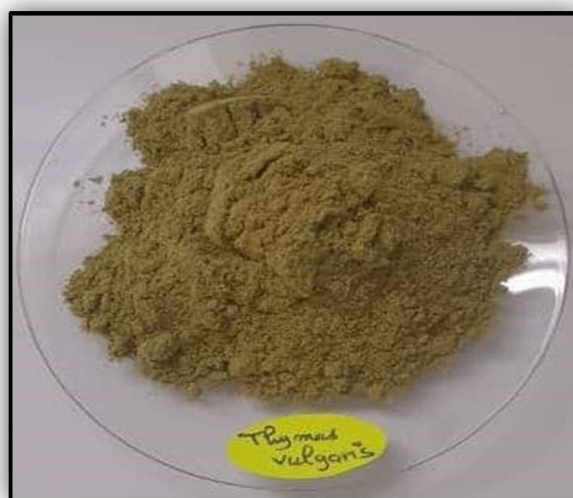
**II .3.1 Matériels utilisés :**

**Tableau N 02 :** Liste des matériels utilisés durant l'expérience.

Verreries et petits matériel	Appareils	Réactifs et produits chimiques	Milieux de cultures
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Béchers</li> <li>▪ Boîtes en verre</li> <li>▪ Boîtes Pétri</li> <li>▪ Ecouvillons stériles</li> <li>▪ Entonnoirs</li> <li>▪ Eprouvettes</li> <li>▪ Erlenmeyers</li> <li>▪ Flacons</li> <li>▪ Lames et lamelles</li> <li>▪ Les embouts</li> <li>▪ Papier filtre</li> <li>▪ Pincés stériles</li> <li>▪ Pipettes Pasteur</li> <li>▪ Portoir</li> <li>▪ Spatule</li> <li>▪ Tubes à essais</li> <li>▪ Verre de montre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agitateur magnétique</li> <li>▪ Autoclave</li> <li>▪ Bain marie</li> <li>▪ Balance analytique (OHAU5)</li> <li>▪ Bec Bunsen</li> <li>▪ Broyeur</li> <li>▪ Etuve</li> <li>▪ Hôte bactériologique</li> <li>▪ Micropipette (100 ul /1000ul)</li> <li>▪ Microscope optique</li> <li>▪ Pied à coulisse</li> <li>▪ Réfrigérateur</li> <li>▪ Secouer</li> <li>▪ Spectrophotomètre (Biochrom-Libra S6)</li> <li>▪ Stérilisateur UV (AIR FLOW Cj-20)</li> <li>▪ Tamis (250 UM)</li> <li>▪ Vortex (Wise mix VM-10)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Acétate de plomb</li> <li>▪ Acétate de sodium</li> <li>▪ Acide sulfurique concentré (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</li> <li>▪ Ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH)</li> <li>▪ Anhydride acétique</li> <li>▪ Carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)</li> <li>▪ Chloroforme</li> <li>▪ Chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>)</li> <li>▪ Chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>)</li> <li>▪ Cristal violet</li> <li>▪ DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>)</li> <li>▪ Eau distillée</li> <li>▪ Eau physiologique</li> <li>▪ Ethanol</li> <li>▪ Folin-Ciocalteu</li> <li>▪ Fuchsine</li> <li>▪ Huile d'immersion</li> <li>▪ Lugol</li> <li>▪ Méthanol</li> <li>▪ Violet Gentiane</li> </ul>	<p>Milieux solides :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chapman</li> <li>▪ Gélose nutritive</li> <li>▪ Milieu Gélosé</li> <li>▪ Muller Hinton</li> <li>▪ Rouge Congo</li> </ul> <p>Milieux liquides :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bouillon nutritif</li> </ul>

### II .3.2 Matériel végétal

Le produit végétal constitué des parties aériennes (tiges et feuilles) de *Thymus vulgaris* a été acheté auprès d'un herboriste de la région de Tiaret en février 2024. La plante a ensuite été broyée et soumise à un tamisage afin d'obtenir une poudre régulière, puis conservée à sec (température ambiante), à l'abri de la lumière et à l'abri de l'humidité (Rabai et *al.*, 2021) (Annex I) .



**Figure N°03** : Poudre fine de *Thymus vulgaris*.

### II.4 Analyses phytochimiques

#### II.4.1 Préparation des extraits

Les extraits aqueux et hydro-éthanoliques de *Thymus vulgaris* ont été préparés par macération dans une proportion de 10 g de poudre fine mélangée à 100 ml de solvant aqueux ou hydro-éthanolique, sous agitation contrôlée à l'aide d'un agitateur installé à une température ambiante pendant 24h (Bouteldja et *al.*, 2021). La solution obtenue a ensuite été filtrée sur papier filtre, évaporée et séchée dans une étuve ventilée à 40 °C pour obtenir un résidu sec, qui a été conservé à -20 C (Figure N°04).

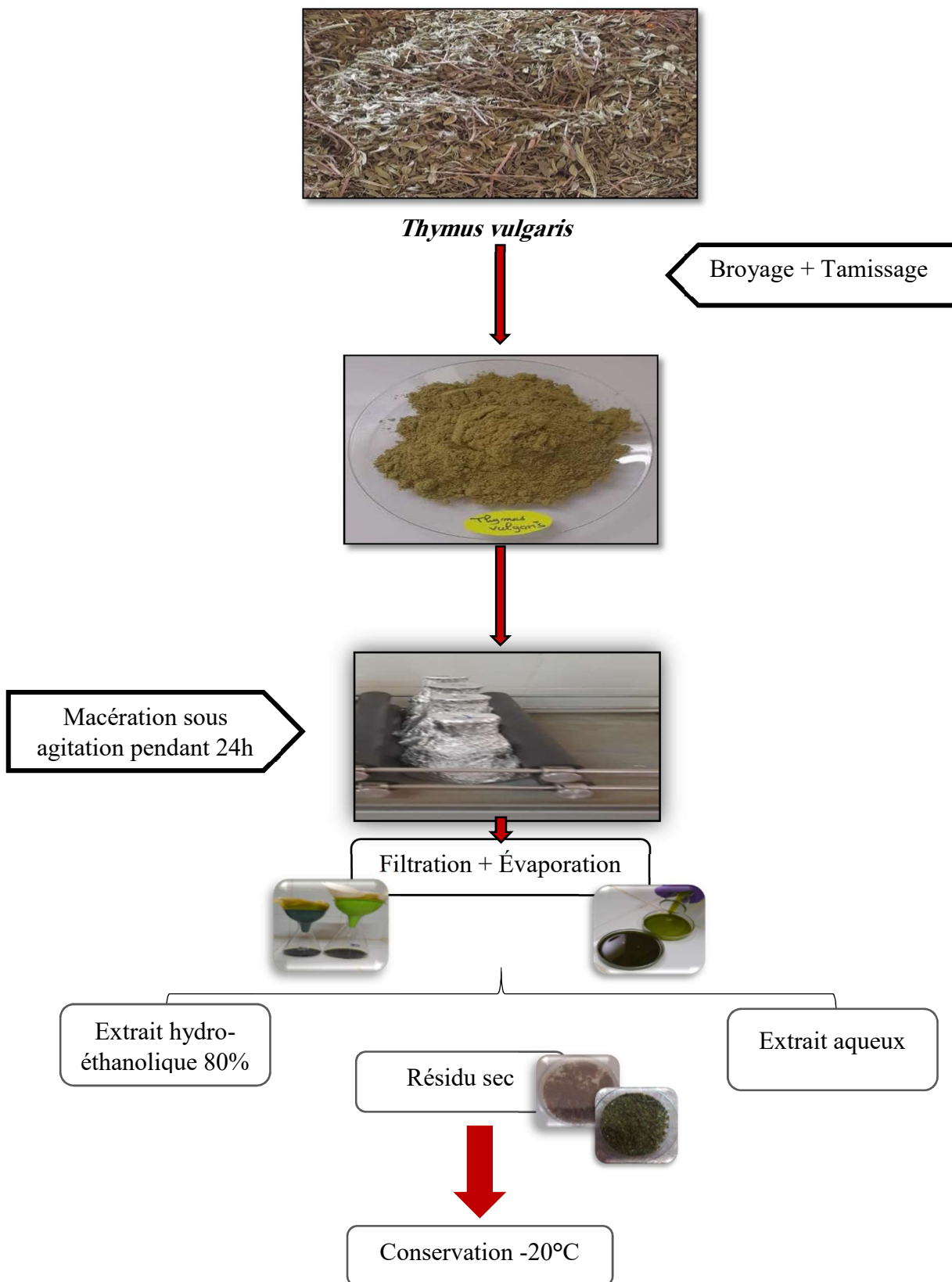


Figure N°04 : Organigramme des étapes de préparation des extraits.

#### II.4.2 Rendement des extraits

On détermine le rendement d'extraction par le rapport entre la masse de résidu sec obtenue et la masse de matière végétale sèche (**Mahmoudi et al., 2013**).

Le rendement des extraits de *Thymus vulgaris* peut être déterminé à l'aide de la formule suivante :

$$R (\%) = (M_{\text{ext}}/M_{\text{éch}}) * 100$$

Soit :

**R(%)** : Rendement de l'extraction.

**M<sub>ext</sub>** : Masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg.

**M<sub>éch</sub>** : Masse sèche de l'échantillon végétal en mg.

#### II.4.3. Screening phytochimique

##### a. Alcaloïdes

Le criblage des alcaloïdes peut être effectué à l'aide du test de Bouchardat. Deux gouttes de réactif de Bouchardat est additionné à 2ml de chaque extrait (aqueux et éthanolique). Une précipitation rouge-brun indique la présence d'alcaloïdes (**Soni et Sosa, 2013**).

##### b. Anthocyanes

Mélanger 1ml de chaque extrait avec 3ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 10% et 1ml de NH<sub>4</sub>OH à 10%. Le résultat est positif s'il y a une coloration qui s'accroît à l'acidification et devient bleue en milieu basique.

##### c. Glycosides cardiaques

Prendre 2ml des deux extraits plus 2ml de chloroforme, puis 3ml d'acide sulfurique concentré. Sa présence se manifeste par la formation d'une couche rouge foncé à brunâtre à l'interface de l'anneau (**Gupta et al., 2016**).

##### d. Flavonoïdes

La solution a été préparée en ajoutant quelques gouttes d'acétate de plomb à 3ml de chaque extrait. Une précipité jaune apparaît, ce qui indique un résultat positif (**Amzad et al., 2013**).

**e. Mucilages**

Leur détection est indiquée par l'addition de 5 ml d'éthanol absolu à 1 ml de chaque extrait. La lecture du résultat positif se fait par l'apparition d'une précipité floconneux (Noudogbessi et al., 2013).

**f. Saponines**

Les saponines sont détectées en introduisant 10 ml de chaque extrait dans un tube à essai. Agiter pendant 15s, puis laisser reposer pendant 15min. Si la hauteur de la mousse est supérieure à 1cm, cela indique que les extraits de plantes contiennent des saponines (EL-Haoud et al., 2018).

**g. Stéroïdes**

Placer 5 ml de chaque extrait dans un tube à essai et ajouter 5 ml d'anhydride acétique, puis 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. La couleur verte indique un résultat positif (Pandey, 2015).

**h. Tanins**

On ajoute 1 à 2 gouttes de solution de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) diluée à 0,1% aux 2ml des différents extraits. La présence de tanins galliques est mise en évidence par le changement de couleur bleu-vert, tandis que l'apparition d'une couleur vert foncé suggère la présence de tanins catéchiques (EL-Haoud et al., 2018).

**i. Terpénoïdes**

Mélanger 0,2g d'extrait sec avec 2ml de chloroforme, dans lequel on ajoute 3ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré. L'apparition d'une coloration rouille à l'interface indique une réaction positive (Mujeeb et al., 2014).

**II.4.4 Dosages des polyphénols totaux**

La présence de polyphénols dans les extraits aqueux et éthanoliques est établie par la méthode Folin – Ciocalteu. Le protocole utilisé est celui de (Ahmadi et al., 2024) avec quelques modifications :

Addition de 2ml de réactif de Folin Ciocalteu à 10%, 1,6ml de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (7,5%) à une série de dilutions de 1 à 1/128 mg/ml. Le mélange est agité puis incubé pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. La lecture spectrophotométrique a ensuite été effectuée à une longueur d'onde de 765nm. Tous

les résultats sont présentés en mg d'acide gallique équivalent /mg par rapport à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Annex III**).

#### **II.4.5 Dosage des flavonoïdes**

La teneur en flavonoïdes est exprimée par une méthode colorimétrique (Chlorure d'aluminium) (**Ahmadi et al., 2022**).

Le protocole expérimentale est consisté à mélanger 0.5ml de chaque dilutions de différents extraits avec 1.5ml de méthanol à (95%) ,0.1ml de chlorure d'aluminium  $AlCl_3$  (10%) ,0.1ml d'acétate de sodium ( $C_2H_3NaO_2$ ) (1M) plus 2.8ml d'eau distillée. Le blanc est préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol (95%).Suivi d'une agitation puis incubation durant 30min à l'obscurité et à une température ambiante. L'absorbance est réalisée à 415nm.

Les résultats obtenus sont présentées en mg équivalant de la quercétine par g et sont référencés à la courbe d'étalonnage de la quercétine (**Taher et al., 2022**) (**Annex III**).

## **II.2. Analyses biologiques**

### **II.2.1. Activité antioxydante**

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de la plante étudiée est effectuée par la méthode de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl,  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ) (**Tirzitis et Bartosz, 2010**).

Le protocole de (**Pereira et al., 2016**) est suivi avec quelques modifications :

Un volume égale des différents dilutions de chaque extrait (0.009 à 5mg/ml) est additionné à un volume de la solution méthanolique du DPPH à raison de 8.2mg par 240ml de méthanol absolu, suivi d'une incubation 37°C pendant 30min à une température ambiante dans l'obscurité. Après la lecture de l'absorbance à 517nm. Le banc est préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol. L'acide Ascorbique est considéré comme un antioxydant de référence (**Annex III**).

Le pourcentage d'inhibition est mesuré par la formule suivant :

$$\% \text{Inhibition} = (Ac - Ae) / Ac * 100$$



Dont :

**Ac** : Absorbance de blanc.

**Ae** : Absorbance d'extrait.

## **II.2.2. Activité antibactérienne**

### **II.2.2.1. Préparation d'inoculum bactérien**

La préparation des suspensions bactériennes à partir des cultures jeunes 18h. Elles se mélangées avec l'eau physiologique et standardisées à l'échelle de 0,5 Mac Farland, suivi d'une lecture spectrale à une longueur d'onde de 625nm (**Bekhichi et al., 2008**).

### **II.2.2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne**

Le pouvoir antibactérien des deux extraits aqueux et éthanoliques du *Thymus vulgaris a* été évalué contre deux souches bactériennes à Gram positif du *Staphylococcus aureus* (référéncée ATCC 25923, isolée). Laboratoire d'hygiène et pathologie animal, Université IBN KHALDOUNE –Tiaret- par la méthode d'imprégnation des disques (**Balouiri et al., 2016**) à une concentration de (6.25mg /ml)

### **II.2.2.3. Méthode de diffusion sur disques**

L'utilisation de la méthode des disques pour évaluer l'activité antibactérienne des deux extraits sur les souches testés.

Le mode opérationnel effectué de celui de (**Mazari et al., 2010**) :

Les suspensions bactériennes (*S.aureus* I et R) sont standardisées à l'échelle de 0.5 Mac Farland, puisensemencées dans des boites de Pétri de gélose Mueller Hinton à l'aide d'un écouvillon stérile. Les disques de papiers Whatman (6mm de diamètre) sont imbibés dans 10µl de chaque extrait aqueux et éthanolique de la plante étudiée à une concentration de (6.25mg /ml) et autre pour le solvant (eau distillée, éthanol) considéré comme un témoin. Le dépôt du disque est réalisé avec une légère pression sur la géloseensemencée. L'incubation des boites pétri à 37°C pendant 24h afin de la diffusion d'extrait durant 2h à une température de 4°C.

Enfin, Les zones d'inhibitions sont déterminées en millimètre à l'aide d'un pied à coulisse. (Figure N°05).

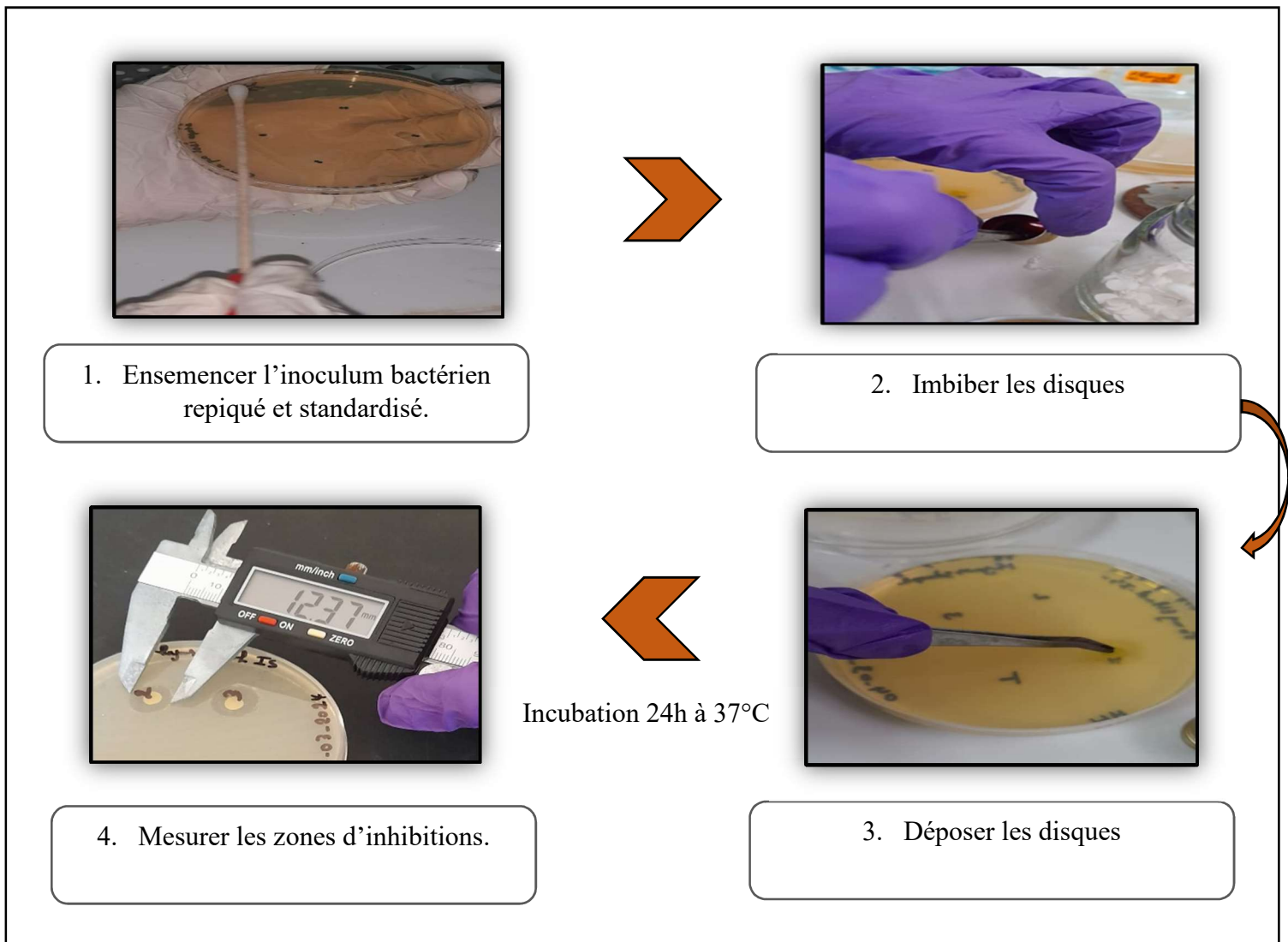


Figure N°05 : Digramme représentatif d'activité antibactérienne

## II.2.3 Evaluation de l'activité antibiofilm

### II.2.3.1. Évaluation de la capacité des souches à former un biofilm

#### II.2.3.1.1. Technique de Rouge Congo

L'évaluation de la capacité de *S.aureus* I et R (ATCC 25923) de former un biofilm a été établi par la technique de Rouge Congo.

Le protocole expérimental suivi est celui de (Sultan et al.,2019) avec quelque modification :

- Couler les boîtes avec gélose nutritive à 5% de saccharose, plus 0.08mg/ml de Rouge Congo et laissées à se solidifier) (Annex VII).
- Ensemencement des souches bactériennes et incubation à 37 °C pendant 24h.
- Les colonies noires indiquent la production de biofilm et les colonies rouges représentent les souches non productrices.

#### II.2.3.2.Activité anti-biofilm

Les deux extraits aqueux et hydroéthanolique à 80% de *T.vulgaris* ont été testés sur les souches productrices de biofilm afin de leurs sectionnements.

L'activité anti-biofilm a été déterminée par l'application de la méthode de Cristal Violet pendant deux phases de déroulement de biofilm :

- a) Inhibition de la formation de biofilm après 5j.
- b) Destruction de biofilm après 5j de production.

##### II.2.3.2.1.L'inhibition de la formation de biofilm après 5jour

La préparation des 4 séries de 8 dilutions des extraits aqueux et hydroéthanoliques de la plante dans un bouillon nutritif glucosé (6.25 ; 3.12 ; 1.56 ; 0.7 ; 0.39 ; 0.19 ; 0.09 :0.045mg/ml), suivie de l'ajout d'un volume égal de suspension bactérienne standardisée à 0.5Macfarland dans chaque tube. Incubation de chaque série pendant 5j.

Après incubation :

- 1) Vider les tubes.
- 2) Lavage trois fois avec l'eau distillée.
- 3) Séchage.

- 4) Traitement avec Cristal Violet à 1% pendant 30min) (**Annex VII**).
- 5) Lavage des tubes avec l'eau distillée pour l'élimination de l'excès de colorant.
- 6) Remplir les tubes avec solution alcoolique (éthanol à 95%).
- 7) Lecture spectrale à 625nm afin de déterminer le pourcentage d'inhibition (**Famuyide et al., 2019 ; Sofy et al., 2020**).

La mesure de pourcentage d'inhibition de formation de biofilm a été déterminée avec la formule suivante :

$$\left[ \frac{(\text{DO}_{\text{Témoin}} - \text{DO}_{\text{Echantillon}})}{\text{DO}_{\text{Témoin}}} \right] \times 100$$

Dont :

- Témoin exprime la souche bactérienne seulement.
- Echantillon exprime les deux extraits de la plante plus la souche bactérienne.

#### **II .2.3.2.2.Distruction de biofilm après 5jours de production**

Remplir 4 séries de 8 tubes stériles avec un volume égale de 2ml de suspension bactérienne standardisée, laissée incuber pendant 5j à 37°C. A la fin de la période d'incubation, l'ajout de 2ml des extraits (séries de dilutions) dans chaque tube .Enfin l'incubation pour une seconde fois à 37°C pendant 24h.

La détermination de pourcentage de destruction de film biologique produit par *S.aureus* l'une isolée et d'autre référenciée ATTC par l'application de même procédure concernant la technique de Cristal Violet (**Olawuwo et al., 2022**).

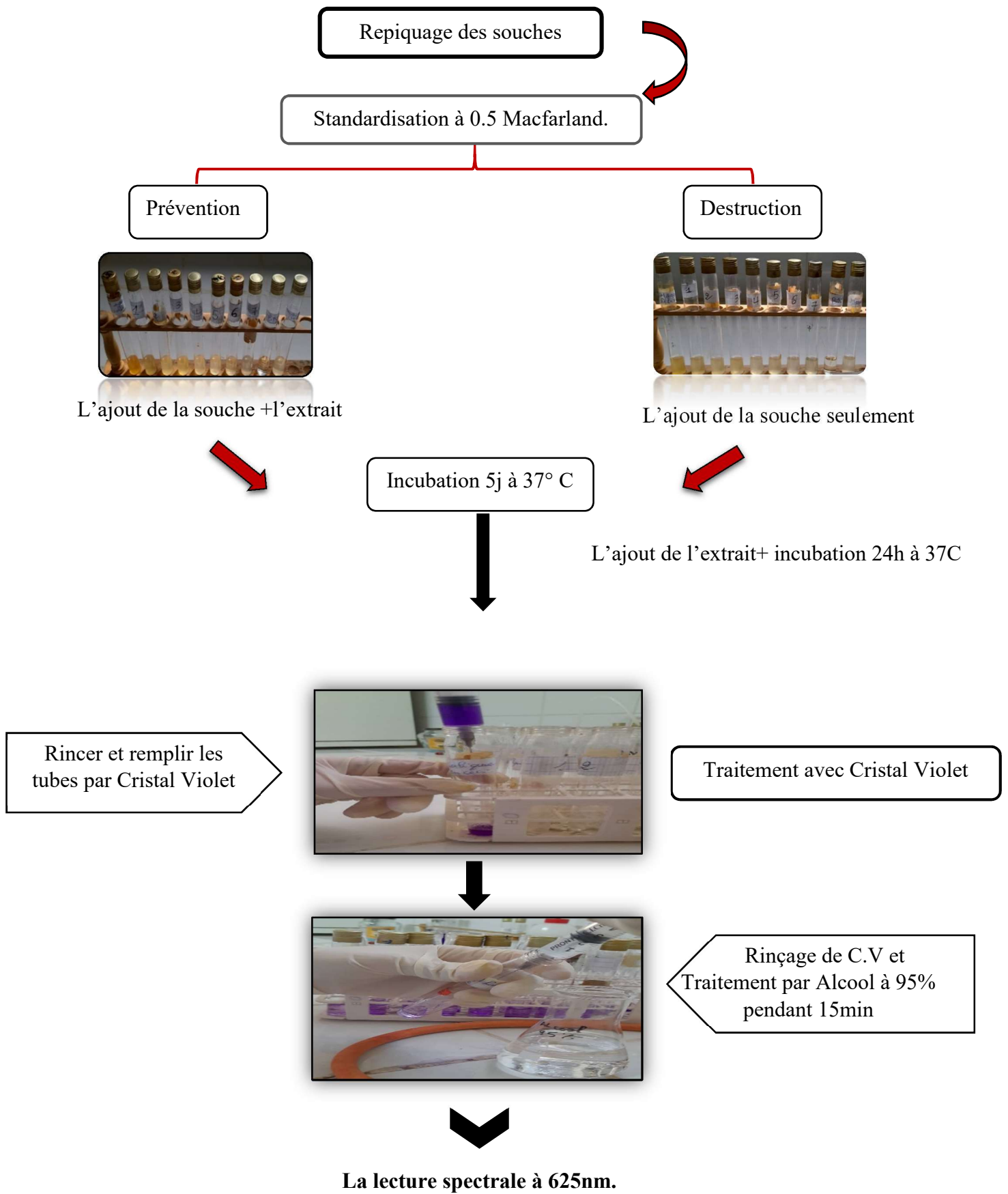


Figure N°06 : Diagramme des étapes de l'activité anti-biofilm .

### Analyses statistiques

Dans notre étude, tous les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Les résultats ont été traités statistiquement à l'aide de Microsoft Excel 2016.

*Partie III.*

*Résultats*

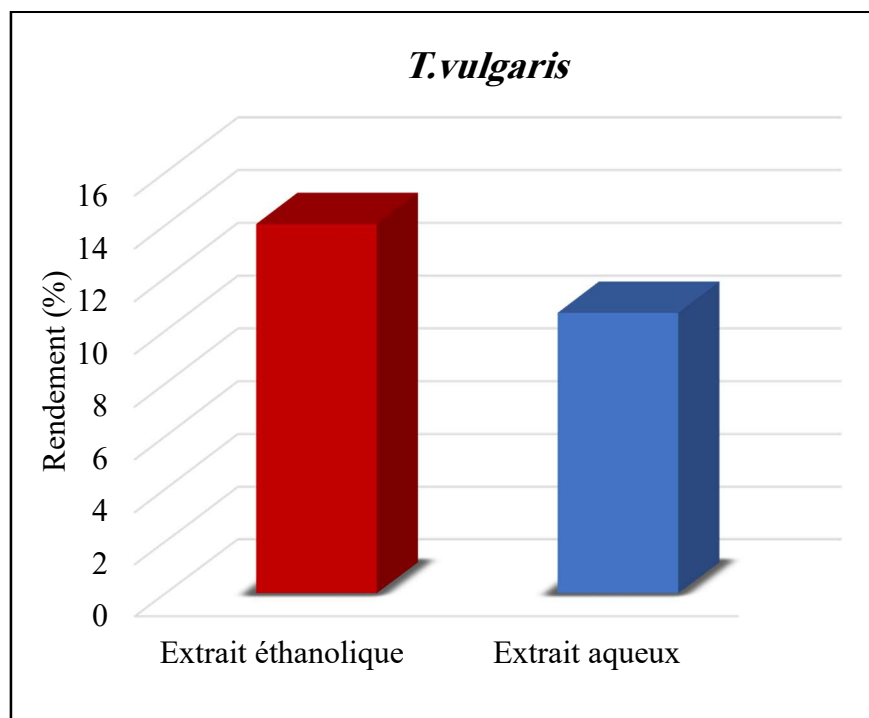
*et*

*Discussion*

### III.1. Analyse phytochimiques

#### III.1.1 Rendement d'extraction

Les résultats des rendements obtenus à partir des extractions aqueuses et hydro-éthanoliques de la partie aérienne de *T. vulgaris* sont présentés dans la **figure N°07**. Le rendement maximal est de 14,03 % pour l'extrait hydro-éthanolique et de 10,66% pour l'extrait aqueux. ) (**Annex II**)



**Figure N°07** : Pourcentage de rendement d'extraction des extrait aqueux et hydroéthanolique 80% de *Thymus vulgaris*.

Nos résultats montrent que les extraits éthanoliques de *T. vulgaris* fournissent des rendements plus élevés que les extraits aqueux. Ceci est cohérent avec les travaux de **Mohammedi et al.** en **2011**, qui ont démontré que l'extrait hydroéthanolique est considéré comme un meilleur solvant d'extraction.

Par contre, les résultats de la recherche d'**Elsherif et al.**, en **2023**, montrent que l'extrait éthanolique de *T. vulgaris* a un faible rendement comparé à l'acétate d'éthyle, à l'extrait aqueux et au chloroforme.

D'autre part, des recherches plus approfondies sur les différents extraits de *T. vulgaris* révèlent que l'extrait méthanolique fournit un rendement maximal par rapport à l'extrait d'éther diéthylique et à l'extrait d'acétate d'éthyle (**Yassin et al.**, **2022**).



Alkufeidy et al. en 2022 révèlent que la polarité de l'extrait éthanolique est plus élevée que celle de l'extrait aqueux.

Le haut rendement de l'extrait d'hydroéthanolique est dû à la polarité du solvant, et la combinaison du solvant organique et de l'eau permet l'extraction des composés solubles (Do et al., 2013 ; Safdar et al., 2016).

### III.1.2. Screening phytochimique

Les résultats acquis (Tableau N°02), révèle la présence de flavonoïdes, terpénoïdes, glycosides cardiaques, mucilages, tanins, stéroïdes et alcaloïdes pour l'extrait éthanolique et aqueux, et l'absence de saponines et d'anthocyanes pour l'extrait éthanolique. ) (Annex II )

**Tableau N03** : Screening phytochimiques des extraits et hydro-éthanolique de *T. vulgaris*

Extraits Substances bioactives	Extrait Aqueux	Extrait éthanolique à 80%
Saponines	+	-
Flavonoïdes	+	+
Terpénoïdes	+	+
Glycosides cardiaques	+	+
Mucilage	+	+
Tanin	-	+
Anthocyanes	-	-
Stéroïdes	-	+
Alcaloïdes	Bouchardat +	Bouchardat +

+ Résultat Positif, - Résultats Négatif.

**Quresh** et ses chercheurs en **2022** ont démontré que l'extrait aqueux de thym était riche en saponines et en flavonoïdes.

Par ailleurs, d'autres travaux montrent que l'extrait hydroéthanolique à 70% de *T. vulgaris* révèle la présence d'alkaloïdes, de glycosides, de flavonoïdes, de saponines, de tanins (**Shaban et al., 2015**).

En revanche, La présence de terpénoïdes, de tanins et de flavonoïdes avec l'absence d'anthocyanes et d'alkaloïdes pour l'extrait éthanolique et aqueux de *T. lanceolatus* (**Benbelaïd et al., 2013**).

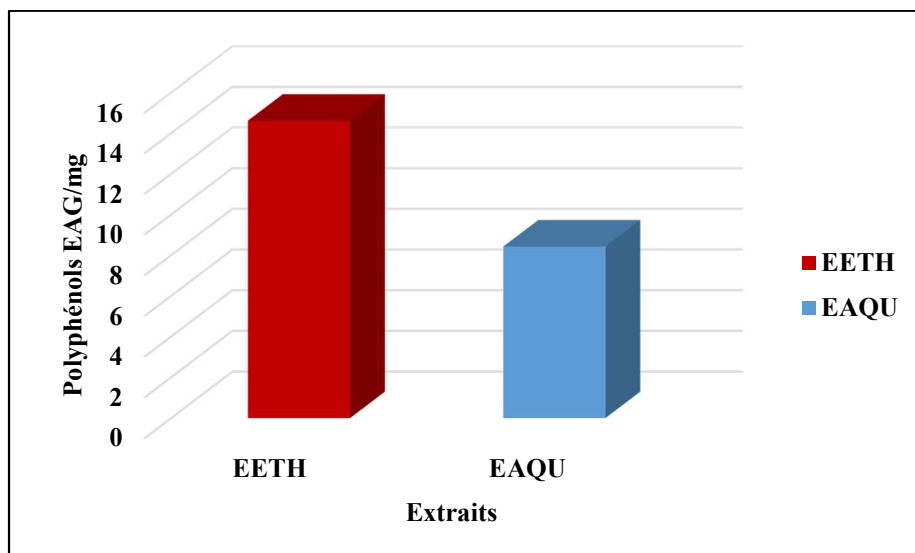
Des travaux antérieurs ont indiqué la présence de phénols, de flavonoïdes, de stéroïdes et de saponines, tandis que des alcaloïdes n'ont pas été détectés dans l'extrait aqueux de *T. vulgaris* (**Qureshi et al., 2022**).

Le criblage phytochimique des différents extraits de *T. vulgaris* a révélé la présence de flavonoïdes et de tanins (**Tamert et al., 2017**). Parallèlement, en **2023**, Elsherif et al. réaliseront un screening phytochimique des différents extraits (éthanol, aqueux, acétate d'éthyle et chloroforme) de *T. vulgaris* en démontrant la présence d'alkaloïdes, de flavonoïdes, de coumarines et l'absence de stéroïdes, de saponines et de glycosides.

En **2023**, **Selim et al.** rapportent que l'extrait alcoolique de *T. vulgaris* se compose de terpénoïdes, de stéroïdes, d'alkaloïdes, de saponines et de flavonoïdes.

### III.1.3. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu total en polyphénols des extraits aqueux et éthanoliques de *T.vulgaris* montre que l'extrait éthanolique a une concentration importante ( $14,61 \pm 2,17$  mg EAG/g) par rapport à celle de l'extrait aqueux ( $8,427 \pm 0,82$  mg EAG/g).



**Figure N°08 :** Le taux de polyphénols totaux des extraits aqueux et hydro-éthanoliques (80%) de *T. vulgaris*

Nos résultats sont validés par les études d'**Eghdami et ses collaborateurs en 2013**, qui rapportent que les extraits éthanoliques (50%) et méthanoliques (50%) révèlent une teneur importante en polyphénols de  $32,34 \pm 2,63$  et  $23,34 \pm 1,3$  mg EAG/g comparativement à ceux obtenus par l'extrait méthanolique de  $5,82 \pm 0,42$  mg EAG/g.

En **2018**, **Amamra et al.**, ont réalisé une étude comparative de la capacité d'extraction de différents solvants pour extraire les polyphénols de *T. vulgaris*, montrant que l'extrait méthanolique ( $270,9 \pm 1,19$  µg EAG/mg) était suivi par l'acétate d'éthyle ( $221,48 \pm 0,71$  µg EAG/mg), le chloroforme ( $166,71 \pm 1,19$  µg EAG/mg), et l'extrait aqueux ( $97,11 \pm 2,83$  µg EAG/mg).

En effet, la teneur en polyphénols varie de 27,36 à 50,22 mg EAG/g pour *T. pulegioides*, et de 28,58 à 59,62 mg EAG/g pour *T. serpyllum* (**Vergun et al., 2022**).

Le contenu polyphénique de l'extrait de *T. vulgaris* atteint de  $356 \pm 9,79$  mg EAG/mg (**Ramchoun et al., 2009**). Par ailleurs, les extraits aqueux et éthanoliques du Thym turc étaient respectivement de 256,0 et de 158,0  $\mu\text{g}$  EAG/mg (**Köksala et al., 2016**).

Plusieurs paramètres peuvent expliquer ces écarts, notamment la région géographique, l'espèce végétale, la température, l'exposition au soleil, les conditions d'extraction, le type de solvant et sa polarité (**El-Bondkly et al., 2022; Fadili et al., 2015**).

### III.1.4. Dosage flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait est présentée dans la figure N°09, elle atteint une valeur maximale pour l'extrait éthanolique (80%) de  $13,08 \pm 0,02$  mg EQ/g et l'extrait aqueux est de  $3,35 \pm 0,02$  mg EQ/g.

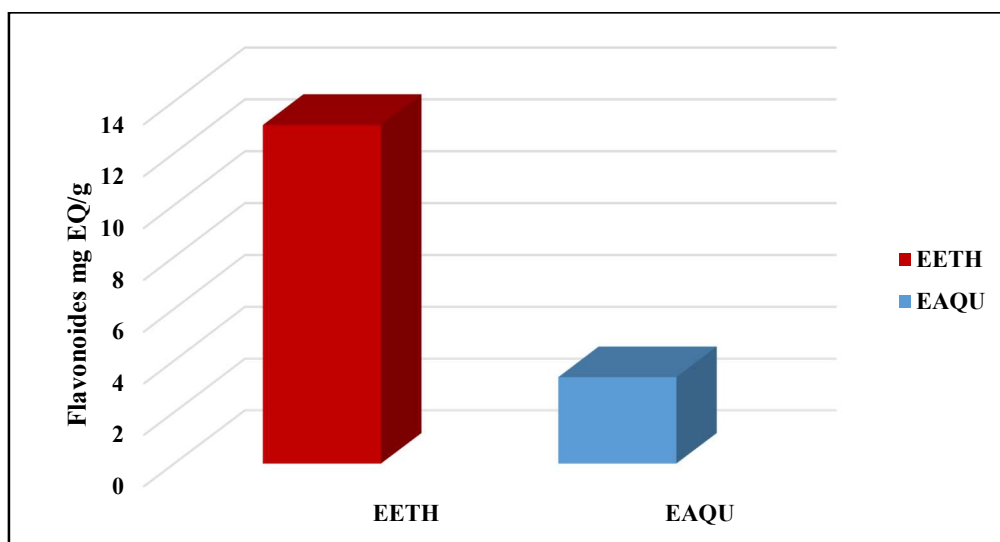


Figure N° 09 : Dosage des flavonoïdes des extraits aqueux et éthanoliques (80%) de *T. vulgaris*

Ces résultats sont confirmés à celui obtenu par **Eghdami et al**, en **2013** qui ont révélé que les extraits éthanoliques (50%), méthanolique et hydrométhanolique (50%) de *T. vulgaris* représentaient une teneur en flavonoïdes de  $14,30 \pm 1,14$  ;  $4,303 \pm 0,05$  et  $13,12 \pm 1,03$  mg EQ/ g.

Les résultats du dosage des flavonoïdes sont en harmonie avec ceux trouvés par **Zeghad et Merghem, 2013**, révélant que l'extrait de *T. vulgaris* L. représente un taux de  $8,56 \pm 0,001$  mg EQ/ g.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait éthanolique de *T. vulgaris* est de  $120,6 \pm 1,316$  mg ER/g, celui du méthanol de  $100,3 \pm 1,132$  mg ER/g, celui de l'acétate d'éthyle de  $165,7 \pm 1,521$  mg ER/g et celui d'aqueux de  $10,58 \pm 0,145$  mg ER/g (**Aouam et al., 2019**).

En **2023**, **Mokhtari et al.**, ont déclaré que l'extrait aqueux de *T. vulgaris* contenait une quantité de flavonoïdes équivalente à  $3.87$  mg EQ/g.

Par contre nos résultats ne sont pas cohérents avec d'autres travaux publiés qui indiquent que l'extrait aqueux de *T. vulgaris* de  $07.63 \pm 0.08 \mu\text{g EQ/ mg}$  (Amamra et al., 2018). Pour leur part, Köksala et al, 2016, montrent que l'extrait éthanolique de *T. vulgaris* a fourni une teneur de  $44,2 \mu\text{g EQ /mg}$  suivi de l'extrait aqueux de  $36,6 \mu\text{g EQ /mg}$ .

### III.2.1. Analyses biologiques

#### III.2.1.1.Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits aqueux et de l'éthanol (80 %) a été déterminée par la méthode DPPH, qui fait apparaître une couleur jaune lors du piégeage des radicaux libres de DPPH (Hidalgo et al.,2010). ) (Annex V )

Les résultats du pouvoir antioxydant des deux extraits sont illustrées dans la figure N°10, exprime que le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH à 50% pour acide Ascorbique, l'extrait aqueux et éthanolique de *T.vulgaris* était de 0,03 , 0,01 et 0,10 mg/ml respectivement .

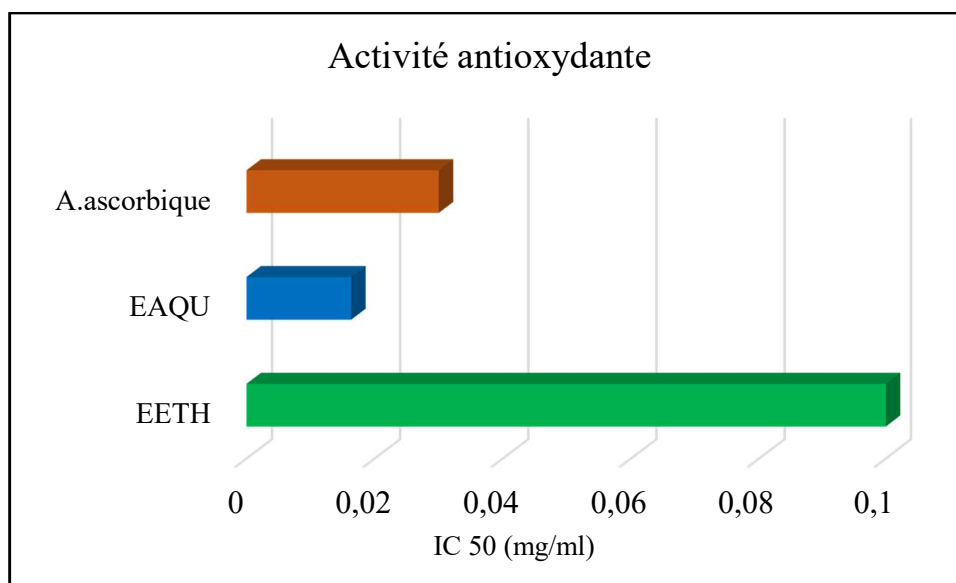


Figure N°10: IC50 (mg/ml) d'A.ascorbique, Extrait éthanolique et aqueux de *T. vulgaris*

Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par El-Guendouz et al., 2019, qui montrent que l'extrait de *T. vulgaris* a la capacité de piéger 50% des radicaux libres DPPH à une concentration de  $93 \mu\text{g/ml}$ . Parallèlement, Alnasser et al., 2023 rapportent le pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique de *T. vulgaris* en piégeant les radicaux libres DPPH avec un pourcentage de 92%.

En 2023, **Mokhtari et al.** ont réalisé une étude comparative sur la capacité des plantes à piéger les radicaux libres DPPH, en révélant que la concentration suffisante pour inhiber 50 % des radicaux libres DPPH dans l'extrait de Thym et la combinaison entre le thym et la sauge était respectivement de 69,39 et 55,51 µg/ml.

On a observé le potentiel de piégeage du radical DPPH maximal dans l'extrait de *T. vulgaris*, avec 83,09 % (**Alrasheed et al., 2023**).

En effet, des études ont montré que le potentiel antioxydant est influencé par divers paramètres, notamment la méthode de stockage des plantes, la méthode d'extraction, la période et le temps (**Pop et al., 2020 ; Benchabane et al., 2015**).

Nos résultats montrent que l'extrait aqueux a une capacité de piégeage des radicaux libres DPPH plus élevée que celle de l'extrait éthanolique. Cette activité peut être attribuée à la forte teneur en saponines de l'extrait aqueux. D'ailleurs, ces molécules ont une forte activité antioxydante qui repose sur leur capacité à piéger les radicaux libres (**Chen et al., 2014**).

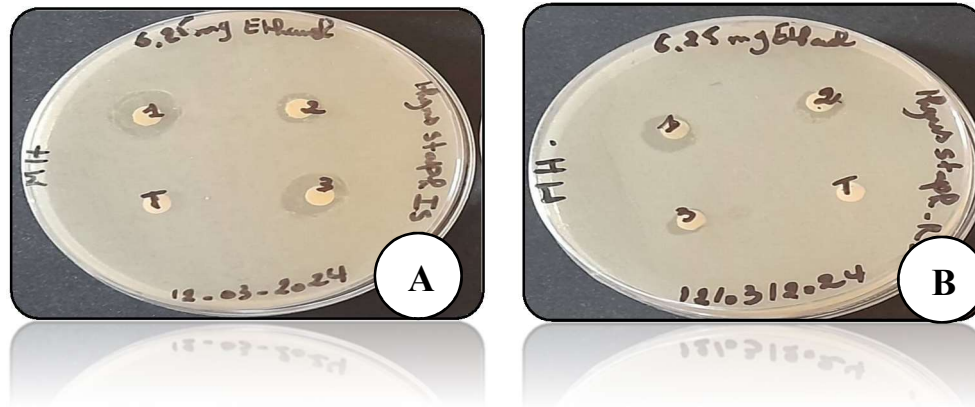
Les extraits de saponine ont une activité antioxydante plus importante en comparaison avec les extraits d'acide ascorbique (**Amnay et Ouriagli, 2022**). D'autres études ont mis en évidence l'effet antioxydant des saponines d'origine végétale (**Olusola et al., 2020**).

En outre, plusieurs études ont affirmé que la teneur en composants phénoliques et flavonoïdes de *T.vulgaris* représente un pouvoir antioxydant naturel (**Shakeri et al., 2024 ; Taira et al., 2015**).

Les antioxydants d'origine végétale, en particulier les polyphénols, ont des effets bénéfiques sur la santé humaine en aidant à combattre le stress oxydatif et ses effets indésirables (**Aquino et al., 2024**).

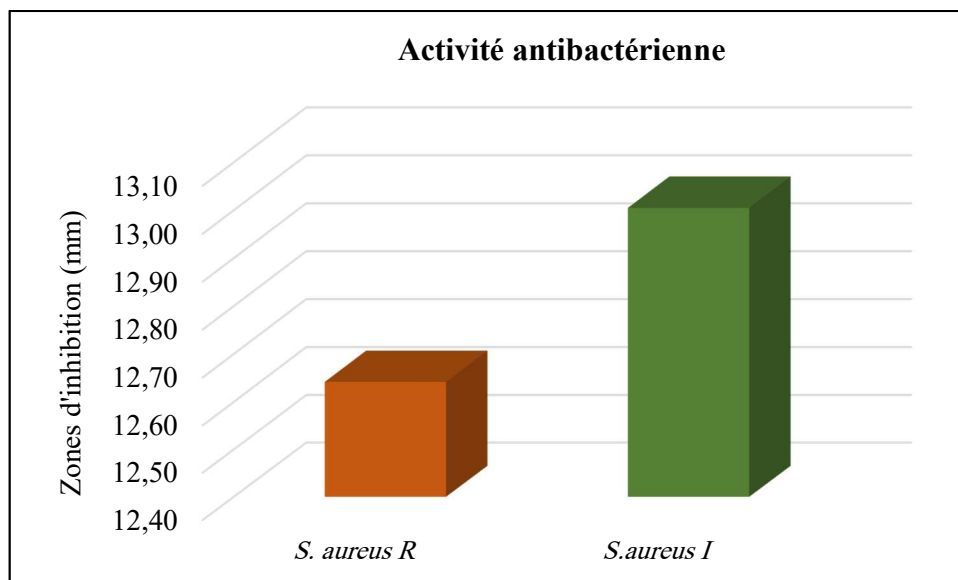
### III.2.2. Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des deux extraits aqueux et hydroéthanolique (80%) a été déterminer par des zones d'inhibitions (mm)(**Figure N°11**).



**Figure N°11** : Zones d'inhibitions (mm) d'extrait éthanolique de *T. vulgaris*. **A**) : *S.aureus* I ; **B**) : *S.aureus* R.

Selon nos résultats, l'extrait éthanolique (80%) a réagi positivement sur les souches bactériennes testées avec des zones d'inhibitions de 12,64 et 13,01mm contre *S. aureus* R et I respectivement. En revanche, l'extrait aqueux n'a montré aucun effet antibactérien contre les souches testées. ) (**Annex VII** )



**Figure N°12** : Activité antibactérienne d'extrait éthanolique *T. vulgaris*.



Ces résultats sont confirmés par les travaux de **Yakhlef et al.** en **2011**. Ceux-ci montrent que les extraits bruts de *T. vulgaris* exercent une activité antibactérienne contre sept souches pathogènes, dont *S. aureus*.

Pour déterminer la sensibilité des souches bactériennes, on observe la présence d'une zone d'inhibition circulaire autour du disque, indiquant l'absence totale de croissance bactérienne (**Bouhdid et al., 2006**).

En **2022**, **Al-Shuneigat et al.** ont rapporté dans leur étude que les huiles essentielles de *T. vulgaris* étaient plus efficaces contre diverses souches bactériennes.

D'autres études confirment que les huiles essentielles de *T. vulgaris* sont très efficaces contre une variété de micro-organismes, dont certains à Gram positif (**Dardona et al., 2024**).

Par ailleurs, d'autres chercheurs soulignent que les souches bactériennes à Gram positif sont plus sensibles que les souches à Gram négatif, en raison de la structure de leur membrane, qui a la capacité d'agir comme une barrière pour les molécules bioactives (**Trigui et al., 2013**).

L'activité antibactérienne des extraits de thym vis-à-vis *Staphylococcus aureus*, a également montré la capacité d'inhibition de tous les différents extraits par des diamètres d'inhibition variables (**Mokhtari et al., 2023 ; Fayad et al., 2013**).

Le potentiel antimicrobien des extraits végétaux de *T. vulgaris* peut dépendre du solvant, de leur concentration, métabolites secondaires et de la souche bactérienne (**Belali et al., 2022; Kasmi et al., 2017**).

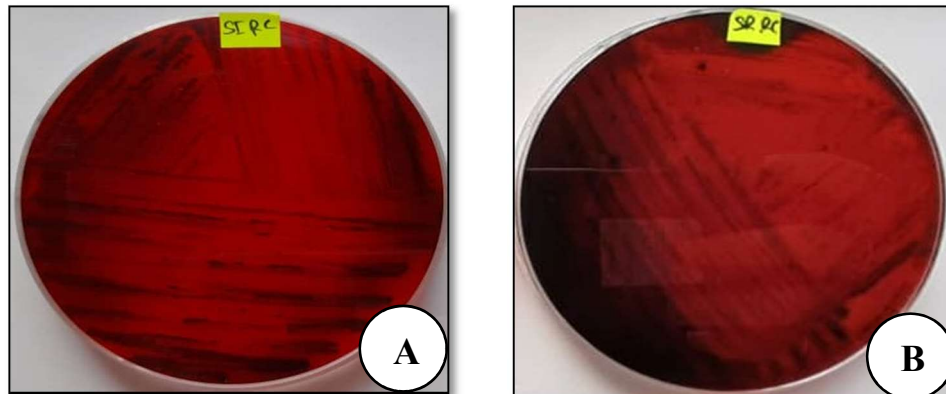
Les extraits des plantes possèdent des composés bioactives ayant des activités antibactériennes (**Szilvassy et al., 2013**).

Les métabolites secondaires issus des extraits de plantes médicinales détruisent les membranes des cellules bactériennes en interagissant avec leurs composants, entraînant une perte de contrôle de la pression osmotique et des fuites dues à la perméabilité à la concentration (**Malo et al., 2005**).

### III.2.3 Evaluation de l'activité antibiofilm

#### III.2.3.1. Technique de Rouge Congo

La capacité de formation de biofilms de la part de deux souches de *S. aureus*, l'une isolée et référencée "ATCC", a été évaluée par la méthode du rouge Congo en gélose nutritive. Les résultats sont exprimés par la couleur : colonies noires sur gélose noire et colonies noires sur gélose rouge.



FigureN°13 : Phénotype de la production de biofilm sur RCA

A) : *S.aureus* I ; B) : *S.aureus* R

Les résultats obtenus sont validés par les travaux de **Salah et al., 2022** ; **Neopane et al, 2018**, qui révèlent que les *S. aureus* isolés sont capables de former des biofilms. De plus, une autre étude de **Hiltunen et al, 2019**, rapporte que la souche de référence *S. aureus* ATCC 25923 a la capacité de former des biofilms.

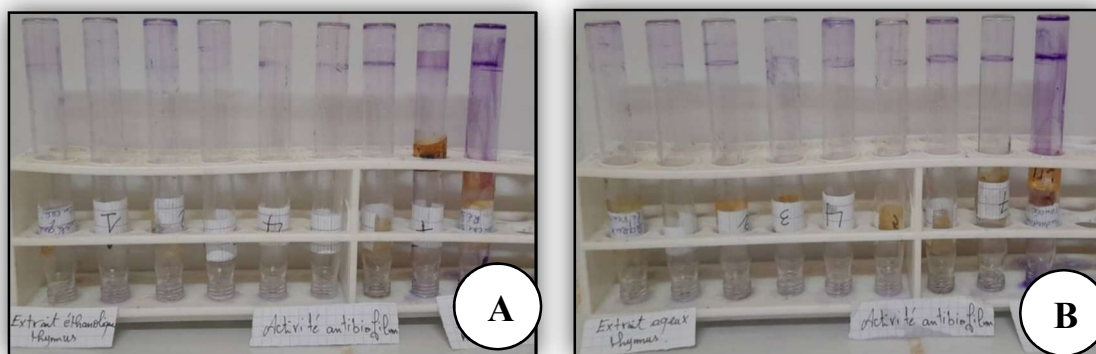
En parallèle, des recherches révèlent que la production de biofilms par *S. aureus* sur milieu Rouge Congo se traduit par l'apparition de colonies noires (**Usun et al., 2022**). Cette couleur noire indique la réaction entre le Rouge Congo et les Exopolysaccharides (EPS) (**Sultan et al., 2019**).

Le biofilm est constitué de structures résistantes appelées substances polymériques extracellulaires (EPS), considéré en tant qu'agent de virulence (**Quresh et al., 2022** ; **Muhsin et al., 2018**).

### III.2.3.2. Activité antibiofilm

#### III.2.3.2.1. Inhibition de la formation de biofilm après 5j

L'efficacité des extraits aqueux et éthanoliques de *T.vulgaris* pour inhiber la formation de biofilms produits par des *S. aureus* isolés et référencés a été déterminée par la méthode Cristal Violet (**Zhenbo et al.,2016**), par la mesure de la biomasse via un spectrophotomètre afin de quantifier la masse du biofilm grâce à la liaison entre le colorant et les exopolysaccharides (EPS) (**Borowicz et al.,2023**).



**Figure N°14** : Traitement par le Cristal Violet.

**A)** : Extrait éthanolique /*S.aureus* R ; **B)** : Extrait aqueux / *S.aureus* R.

Les résultats obtenus ont révélé un pourcentage significatif d'inhibition de la production de biofilm de *S. aureus* R de  $(99,29 \pm 0.00$  et  $47,5 \pm 0.00\%$ ) et de  $(97,79 \pm 0.14$  et  $42,33 \pm 0.29 \%$ ) pour les extraits éthanoliques et aqueux respectivement à une concentration de 6,25 mg/ml et de 3,12 mg/ml,  $92,82 \pm$  et  $33,75 \pm \%$  (1,562mg/ml), 78,14 et  $20,08 \pm \%$  (0,781 mg/ml) et  $32,75 \pm$  et  $15,08 \pm \%$  (0,39 mg/ml). ) (**Annex VIII**)

En outre, la capacité des extraits éthanoliques et aqueux de *T.vulgaris* à empêcher la formation du biofilm de *S. aureus* I était de  $99,54 \pm$  et  $50,84 \pm \%$  à une concentration de 6,25 mg/ml, puis à  $96,55 \pm 0.13$  et  $34,7 \pm 0.24\%$  (3,12 mg/ml),  $89,88 \pm 0.01$  et  $29,77 \pm 0.12\%$  (1,562mg/ml),  $78,26 \pm$  et  $24,92 \pm 0.25\%$  (0,781 mg/ml) et  $47,83 \pm$  et  $17,22 \pm 0.12\%$  (0,39 mg/ml).

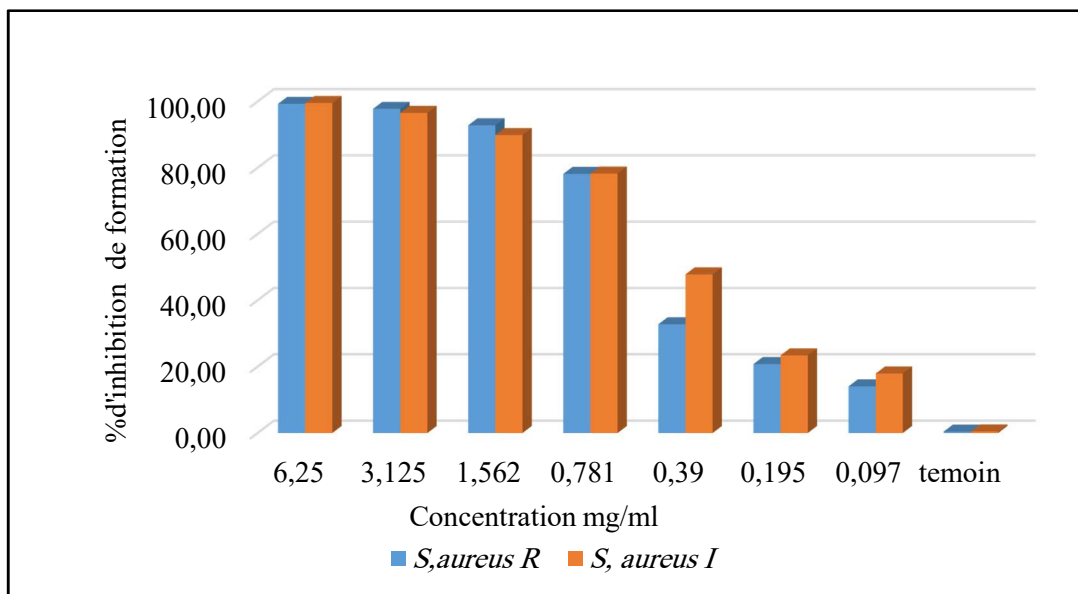


Figure N°15 : Pourcentage d'inhibition de formation de biofilm par l'extrait éthanolique de *T.vulgaris*.

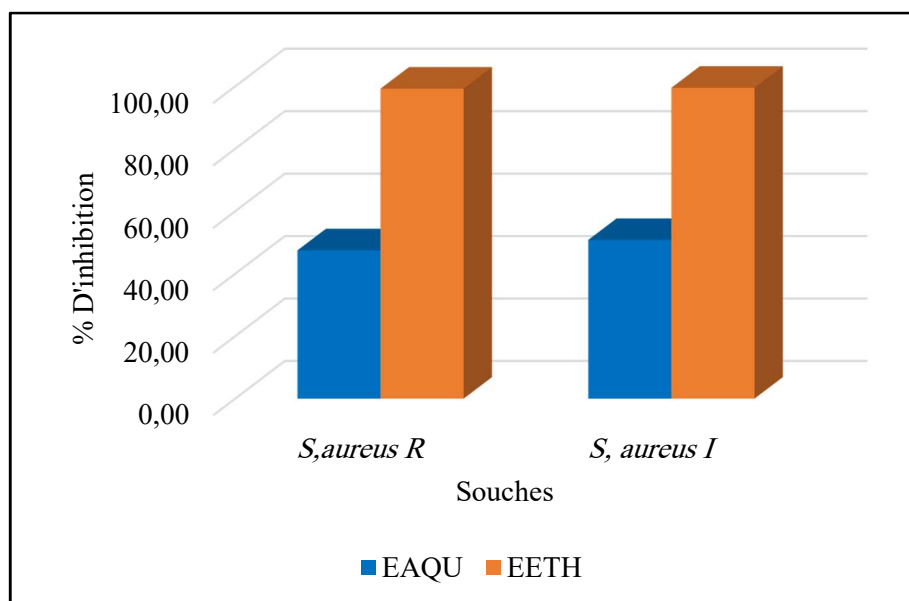


Figure N°16 : Pourcentage d'inhibition de formation de biofilm par les deux extraits de *T.vulgaris*

Ces résultats obtenus montrent que le pourcentage d'inhibition dépend sur la nature du solvant et leur concentration, Ceci est confirmé par les travaux de **Mohsenipour et Hassanshahian, 2015**, montrent que les effets inhibiteurs des extraits de *T. vulgaris* sur les structures du biofilm sont significatifs en fonction du type de bactérie, du type de solvant et de la concentration de l'extrait.

Par ailleurs, d'autres auteurs signalent que l'extrait et l'huile essentielle de *T. vulgaris* L. permettent de réduire de manière significative le biofilm formé par *S. mutans* et *S. aureus* (**Oliveira et al., 2017**).

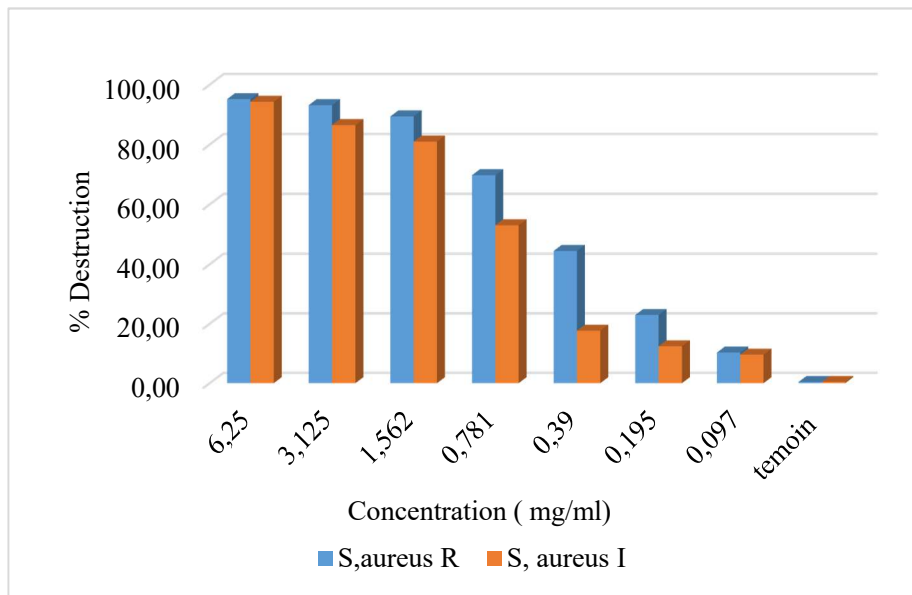
En **2024**, **Oalde et al.**, indiquent que le niveau global le plus élevé d'inhibition de la formation de biofilms a été obtenu avec des extraits de plantes appartenant à la famille des Lamiacées, dont *M. officinalis*, *M. piperita*, *R. officinalis*, *S. montana*, *T. chamaedrys*, *T. montanum*, *T. serpyllum* et *T. vulgaris*.

En revanche, le traitement de biofilms formés par des staphylocoques à l'aide d'un extrait aqueux de thym a entraîné une réduction du nombre de cellules adhérentes et une inhibition de la formation du biofilm (**Qureshi et al., 2022**).

#### **III.2.3.4.2. Destruction de biofilm après 5 jours de production**

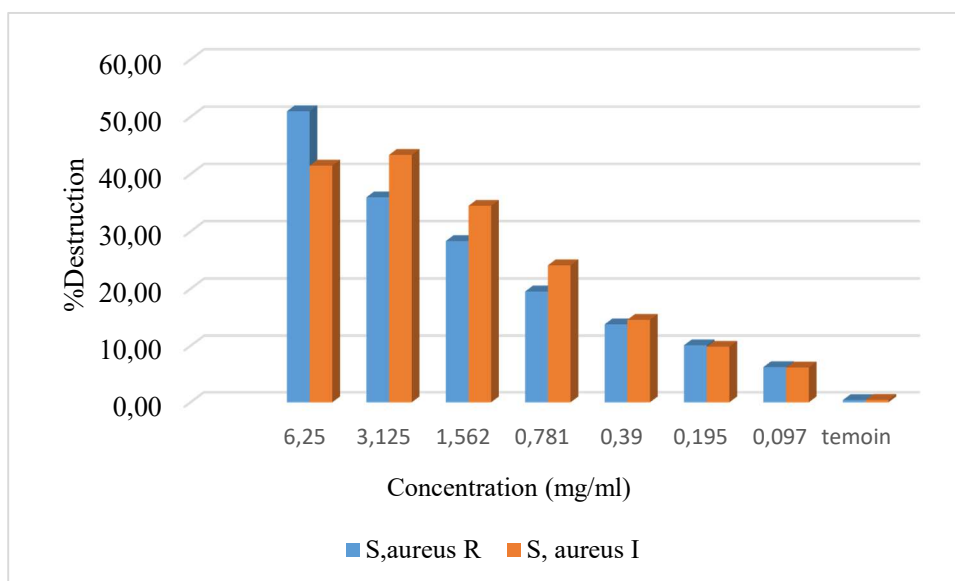
La capacité des extraits aqueux et hydro-éthanolique 80% de *T.vulgaris* de détruire le biofilm synthétisé pendant 5 jours.

D'après nos résultats l'extrait hydro-éthanolique 80% possède une forte activité de dégradation du biofilm formé dans une période de 5 jours par *S.aureus* I et R avec des taux significatifs atteints ( $94,29 \pm 0,14$  % à 6,25 mg/ml et  $86,54 \pm 0,14$  % à 3,125mg/ml et  $80,99 \pm 0,23$  % à 1,562 mg/ml et  $53,05 \pm 0,00$  % à 0,781mg/ml) et ( $95,19 \pm 0,00$  % à 6,25 mg/ml et  $93,19 \pm 0,28$  % à 3,125mg/ml et  $89,42 \pm 0,00$  % à 1,562 mg/ml et  $69,79 \pm 0,14$  % à 0,781 mg/ml) respectivement.



**Figure N°17** : Destruction de biofilm par l'extrait éthanolique de *T.vulgaris*

On outre, la capacité de l'extrait aqueux de *T.vulgaris* à détruire le biofilm formé par *S.aureus* I et R durant 5 j d'incubation a représenté dans des pourcentages atteints ( $41,50 \pm 0,08\%$  à 6,25 mg/ml et  $43,37 \pm 0,30\%$  à 3,125mg/ml et  $34,48 \pm 0,09\%$  à 1,562 mg/ml et  $24,10 \pm 0,21\%$  à 0,781mg/ml) et ( $50,99 \pm 0,00\%$  à 6,25 mg/ml et  $35,96 \pm 0,00\%$  à 3,125mg/ml et  $28,33 \pm 0,25\%$  à 1,562 mg/ml et  $19,54 \pm 0,00\%$  à 0.781 mg/ml) respectivement. Nos résultats sont validés par les travaux de **Nostro et al, 2016**, montrant l'efficacité des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* pour éradiquer les biofilms produits par *S. aureus*.



**Figure N°18** : Destruction de biofilm par l'extrait aqueux de *T.vulgaris*.

Les métabolites secondaires de *T. vulgaris* exercent un effet antibiofilm (**Liu et al.,2013**).

En **2017**, les chercheurs ont évalué la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de thym, suggérant leur potentiel dans la lutte contre les biofilms microbiens (**Silva et al.,2017**).

La recherche de **Rasteiro et ses collègues**, en **2014**, a mené une étude sur l'efficacité de l'huile essentielle de *T. vulgaris* et en combinaison avec des antibiotiques contre les biofilms de *Staphylococcus aureus*, ce qui a montré des effets significatifs de l'huile essentielle sur la biomasse du biofilm et la viabilité bactérienne.

En outre, plusieurs études indiquent que les huiles essentielles de *T. vulgaris* inhibent de manière significative la formation de biofilms produits par *S. mutans* (**Khan et al.,2017 ; Martins et al.,2012 ; Faria et al.,2011**).

*Conclusión*



La formation de biofilms contribue au développement de mécanismes de résistance aux différentes classes d'antibiotiques chimiques et cela représente des problèmes pour la santé humaine, nécessitant la recherche de solutions et d'alternatives d'origine naturelle.

Les substances bioactives présentes dans les plantes médicinales, en particulier *T. vulgaris*, agissent en perturbant la formation de biofilms bactériens, offrant ainsi une alternative thérapeutique naturelle efficace, et leur utilisation peut contribuer à réduire la prévalence des infections associées aux biofilms.

Dans le cadre de cette étude, nous avons effectué plusieurs analyses sur l'extrait aqueux et l'extrait hydroéthanolique à 80% de *T. vulgaris*, notamment un criblage phytochimique pour détecter la présence de substances bioactives et pour évaluer l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne contre *S. aureus*.

Isolée du lait contaminé, ainsi que l'activité antibiofilm contre le biofilm produit par les deux souches bactériennes.

Le rendement des résidus secs obtenus à partir des extraits aqueux et hydroéthanoliques à 80 % de la plante *T. vulgaris* était respectivement de 10,66 % et 14,03 %.

Le criblage phytochimique indique que l'extrait aqueux de *T. vulgaris* est riche en saponines, flavonoïdes, terpénoïdes, glycosides cardiaques, mucilages et alcaloïdes, tandis que l'extrait d'hydroéthanol à 80 % montre la présence de flavonoïdes, Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes enregistrées dans l'extrait éthanolique de *T. vulgaris* sont élevées (14,61 mg EAG/g et 13,08 mg EQ/g) par rapport à celles de l'extrait aqueux (8,42 mg EAG/g et 3,35 mg EQ/g) respectivement.

D'autre part, l'activité antioxydante de l'extrait aqueux de *T. vulgaris* était significativement plus élevée que celle de l'extrait éthanolique, avec des valeurs IC50 de 0,01 et 0,10 mg/ml. En effet, l'activité antibactérienne de la plante montre une inhibition de 80% de l'extrait éthanolique contre les *S.aureus* isolés et référencés, avec des zones d'inhibition de 12,64 et 13,01mm contre les *S.aureus* R et I respectivement.

En outre, l'évaluation de l'activité antibiofilm par la méthode du cristal violet a établi une forte capacité de l'extrait d'hydroéthanolique à 80 % de *T.vulgaris* à inhiber

la formation et à détruire le biofilm produit par *S. aureus* référencé et isolé, tandis que l'extrait aqueux a montré une capacité relativement faible à lutter contre le biofilm.

En conclusion, notre étude met en évidence la capacité des extraits de *T. vulgaris* à être utilisés comme agents antibactériens et anti-biofilm contre *Staphylococcus aureus*. Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives pour la création de traitements alternatifs basés sur des composés naturels pour lutter contre les infections bactériennes.

*Références*

*Bibliographiques*

*A*

- ✚ **Ahmadi.H., Morshedloo.M.R., Emrahi.R., Javanmard.A.,Rasouli.F., Maggi.F., Lorenzo.J.M.(2022).**Introducing three new fruit-scented mints to farmlands: insights on drug yield, essential-oil quality, and antioxidant properties *Antioxid*, 11 (5), p. 866
- ✚ **Ahmadi.H.,Fatahi.R.,Zamani.,Z.,Poczai.,P.,Shokrpour.M.(2024).** Unraveling the transcriptional regulators of polyphenolic variation in *Thymus daenensis* Celak.*Industrial Crops and Products* .(2)14.DOI:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118551>
- ✚ **Alkufeidy.M.R., AlFarraj.D.A., Aljowaie.R.M., Ajmal.M.A.,Elshikh.,M.S.(2022).** Chemical composition of *Thymus vulgaris* extracts and antibacterial activity against pathogenic multidrug resistance bacteria. *Physiological and Molecular Plant Pathology* DOI :<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101745>
- ✚ **Alnasser Sulaiman M. (2023).** "Total Phenols Compounds, Ferric Reducing Antioxidant Power and Scavenging Activities of *Thymus Vulgaris* L. Crop Extracts: Analgesic, Anti-Inflammatory, Anxiolytic, Antidepressant Responses in Swiss Strain Male Albino Mice, and Anti-Bacterial Effects". *Polish Journal of Environmental Studies*, 32(6): 5469-5481. doi:10.15244/pjoes/169713.
- ✚ **Alrasheed Amel Ahmed, Alrasheid Ayat Ahmed, Abdalla Wafaa Mohamed, Saeed Samar Mohammed, and Ahmed Hind Haidar. (2023).** Antimicrobial and Antioxidant Activities and Phytochemical Analysis of *Rosmarinus officinalis* L. Pod and *Thymus vulgaris* L. Leaf Ethanolic Extracts on *Escherichia coli* Urinary Isolates. *International Journal of Microbiology*, 7: 1-7. Pages <https://doi.org/10.1155/2023/4171547>.
- ✚ **Amamra Samra, Cartea Maria Elena, Belhaddad Oum Elkheir, Soengas Pilar, Baghiani Abderrahmane, Kaabi Ilhem, Arrar Lekhmici. (2018).** Determination of Total Phenolics Contents, Antioxidant Capacity of *Thymus vulgaris* Extracts using Electrochemical and Spectrophotometric methods. *International journal of electrochemical science*, 13 : 7882 – 7893. doi: 10.20964/2018.08.57

- ✚ **Amnay Abdellatif, Ouriagli Taha. (2022).** Evaluation of the Antioxidant Activity of Saponins Extracts in *Marrubium vulgare* L., *Current Developments in Nutrition*, 6, 502.<https://doi.org/10.1093/cdn/nzac077.005>.
- ✚ **Amzad.M.H., AL-Raqmi.K.A.S., AL-Mijizy.Z.H., Weli.A.M., Al-Riyami.Q.(2013).** Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. volume 3, Issue 9 P705-710.DOI :[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60142-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60142-2)
- ✚ **Aouam I., EL Atki Y., Taleb M., Taroq A., EL Kamari F., Lyoussi B., Abdellaoui A. (2019).** Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of *Thymus riatarum*. *Materials Today: Proceedings*, 13 (3): 579-586. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.04.016>.

### *B*

- ✚ **Babotă.M.,Frumuzachi.O., Nicolescu.A., Dias .M.I.,Pinela.J., Barros.L.,Crişan.G.,(2023).** *Thymus* Species from Romanian Spontaneous Flora as Promising Source of Phenolic Secondary Metabolites with Health-Related Benefits *Antioxid*, 12 (2), p. 390
- ✚ **Bag G.C., Grihanjali Devi P., Bhaigyabati Th. (2015).** Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three *hedychium* species of manipur valley. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 30(1), 154-159.
- ✚ **Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. K. (2016).** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Pharmaceutical. Analysis*, 6:71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- ✚ **Bekhechi.C., Atik-Bekkara.F., Abdelouahi.D.E. (2008).** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*origanum glandulosum* d'Algérie. *pharmacologie, phytothérapie*, 6 : 153\_159
- ✚ **Benbelaïd Fethi, Khadir Abdelmounaïm, Abdoune Mohamed Amine, and Bendahou Mourad. (2013) .** Phytochemical screening and in vitro antimicrobial activity of *Thymus lanceolatus* Desf. from Algeria. *Asian Pac J Trop Dis*.Dec;3(6):454–9. doi: 10.1016/S2222-1808(13)60100-0. PMID: PMC4027338.

- ✚ **Benbelaïd Fethi, Khadir Abdelmounaïm, Abdoune Mohamed Amine, Bendahou Mourad. (2013).** Phytochemical screening and in vitro antimicrobial activity of *Thymus lanceolatus* Desf. from Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(6): 454-459. doi: 10.1016/S2222-1808(13)60100-0.
- ✚ **Benchabane Otmane, Hazzit Mohamed, Mouhouche Fazia, Baaliouamer Aoumeur. (2015).** Influence of Extraction Duration on the Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil of *Thymus pallescens* de Noé. *Arab J Sci Eng*, 40:1855–1865. DOI 10.1007/s13369-015-1694-x.
- ✚ **Bezoui M. (2016).** Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine. Thèse de master : Pharmacie. Rabat : Université Mohammed V- Rabat. P 110.
- ✚ **Bhaigyabati Th., Grihanjali Devi P., Bag GC. (2014).** Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Aqueous Rhizome Extract of Three *Hedychium* Species of Manipur Valley. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(5):970- 976.
- ✚ **Bouhdid S, Idaomar M, Zhiri A, et al. (2006)** *Thymus* essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, substances naturelles et environnement. Congrès international de biochimies*, Agadir, pp. 324–7
- ✚ **Boutheldja.R., Doucene.R., Aggad.H., Abaid.S. (2021).** Phytochemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of *salvia officinalis* (L.) extracts from the tiaret region. *Europeon Journal of Biological Research*, 11(3): 356-366

### C

- ✚ **Castagnaa.J., Kurihara.F., Amsler.E., Soriaa.A., Barbaud.A. (2022).** Quelques déboires avec la phytothérapie. *Revue française d'allergologie*, 62 : 282284.
- ✚ **Castagnaa.J., Kurihara.F., Amsler.E., Soriaa.A., Barbaud.A. (2022).** Quelques déboires avec la phytothérapie. *Revue française d'allergologie*, 62 : 282284. DOI : [https://doi : 10.3389/fvets.2022.820304](https://doi.org/10.3389/fvets.2022.820304)
- Catheter-associated urinary tract infectious due to *Echerichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev.*; 21: 26-59.
- ✚ **Chen Y, Miao Y, Huang L, Li J, Sun H, Zhao Y, Yang J, Zhou W. (2014).** Antioxidant activities of saponins extracted from *Radix Trichosanthis*: an in vivo

and in vitro evaluation. BMC Complement Altern Med, 14:86. doi: 10.1186/1472-6882-14-86.

*D*

- ✚ **Dehpour A., Ibrahimzadeh M. A., Seyedfazelet N., Seyed M. (2009).** Antioxydant activity of the methanol extract of *Ferula Assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas Y Aceites*, 60(04): 405-412. <https://doi.org/10.3989/gya.010109>.
- ✚ **Do Q. D., Angkawijaya A. E., Tran-Nguyen Ph. L., Huynh L. H., Soetaredjo F.E., Ismadji S., Yi-Hsu J. (2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal of food and drug analysis*, 22: 296 -302.

*E*

- ✚ **Eghdami Anoosh, Eizadi Mojtaba, Sadeghi Fatemeh. (2013).** Polyphenolic content and antioxidant activity of hydroalcoholic and alcoholic extract of *Thymus vulgaris*. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 3 (5): 94-101.
- ✚ **El-Guendouz Soukaïna, Aazza Smail, Dandlen Susana Anahi, Majdoub Nessrine, Lyoussi Badiaa, Raposo Sara, Antunes Maria Dulce, Gomes Vera, Miguel Maria Graça. (2019).** Antioxidant Activity of Thyme Waste Extract in O/W Emulsions. *Antioxidants (Basel)*,25(8):243. doi:10.3390/antiox8080243.
- ✚ **EL-Haoud Hamid., Boufellous Moncef., BerraniAssia., HindTazougart., et BengueddourRachid. (2018).** SCREENINGPHYTOCHIMIQUE D'UNEPLANTEMEDICINALE : *MenthaSpicata*L. *Am. J. Inn. Res. AppliedSc*, 12, 2429-5396.
- ✚ **Elsherif Khaled Muftah, Ewlad-Ahmed Abdunaser Mabrok, Alhlbad Ebtessam Abdallah Ahmed, Iqneebir Abdulrhman Mohammed. (2023).** Phytochemical Screening, Antioxidant Capacity Measurement, and Mineral Content Determination of *Thymus vulgaris* L. Extracts. *Walisongo Journal of Chemistry*, 6 (2): 168-180. DOI: <https://doi.org/10.21580/wjc.v6i2.17818>.

*F*

- ✚ **Famuyide.M.J., Abimbola.O.A., Folorunso.O.F., Jcobus.N.E., LyndyJ.M. (2019).** Antibacterial ant antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine under-

investigated south Africa *Eugenia* and *Syzygium* (Myrtaceae) species and their selectivity indices. *BMC complementary and alternative medicine*, 19:141.

- ✚ **Faria, N. C. G.(2011).** In vitro activities of essential oil from *Thymus vulgaris* L. against *Cryptococcus neoformans*. *Canadian Journal of Microbiology*.
- ✚ **Farooq Mahrye Anwar, Tahir Mehmood, Rahman Qadir, Muhammad Riaz. (2021).** Phenolics profiling and biological activities of different solvent extracts from aerial parts of wild thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Food Measurement & Characterization*; New York 16, N° 1, (Feb 2022): 610-618. DOI:10.1007/s11694-021-01185-1
- ✚ **Fayad N.K., AL- Obaidi Omar Hamad Shehab, Al-Noor Taghreed H., Ezzat Mohammed Oday. (2013).** Water And Alcohol Extraction Of Thyme Plant (*Thymus Vulgaris*) And Activity Study Against Bacteria, Tumors And Used As Anti-Oxidant In Margarine Manufacture. *Innovative Systems Design and Engineering www.iiste.org*, 4(1), 42-51.
- ✚ **Flemming.H., Hullebusch.E.D., Thomas.R.N., Nielsen.P.H., Seviour.T., Stoodley.P., Wingender.J., Wuertz.S. (2023).** The biofilm matrix: multitasking in a shared space. *Nature Reviews Microbiology*, 21 : 70–86.
- ✚ **Folkesson A., Haagensen J A J., Zampaloni C., Sternberg C., and Molin S. (2008).** Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides. *Public Library of Science; 3genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev* ; 64 : 847–867.

### G

- ✚ **Gupta.D., Dubey.J., Kumar.M.(2016).** Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected common human pathogenic microorganisms. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. Volume 6, Issue 1 P 15--20 DOI :[https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60978-1](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60978-1)

### H

- ✚ **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**



✚ **Hiltunen Anna K., Savijoki Kirsi, Nyman Tuula A., Miettinen Ilkka, Ihalainen Petri, Peltonen Jouko ,Fallarero Adyary. (2019).** Structural and Functional Dynamics of Staphylococcus aureus Biofilms and Biofilm Matrix Proteins on Different Clinical Materials. *Microorganisms*, 7(584): 1-27.doi:10.3390/microorganisms7120584

✚ **Høiby N., Ciofu O., Johansen H K., Song Z J., Moser C., Jensen P., and Bjarnsholt T.(2011).** The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of OralSciences*; 3 (2): 55-65.

*J*

✚ **Jacobsen S M., Stickler D J., Mobley M L., & shiliff M E. (2008).** Complicated

✚ **Jamal.M., Ahmad.W., Jalil.F., Imran.M., Nawaz.M.A., Hussain.T., Ali.M., Rafiq.M., Kamil.M.A.(2018).** Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81 : 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>.

✚ **Jamali.A.C., ElBouzidi.L., KhalidBekkouche.K., Hassani.L., Markouk.M., Wohlmuth.H., David., L., Abbad.A.(2012).** Chemical Composition and Antioxidant and Anticandidal Activities of Essential Oils from Different Wild Moroccan Thymus Species. 9 (6) 1188-1197 DOI : <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200041>

*K*

✚ **Khan, R.(2017).** Chemical composition and antibiofilm activity of Thymus vulgaris essential oil against cariogenic bacterium Streptococcus mutans. *International Journal of Molecular Sciences*

✚ **Köksala Ekrem, Bursal Ercan , Gülçin İlhami, Korkmazi Mustafa, Çağlayan Cüneyt Gören Ahmet C., and Saleh Alwase H. (2016).** Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (Thymus vulgaris) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 514–525. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1168438>

✚ **Kolter R., Lemon K P., Earl A M., Vlamakis H C., Aguilar C. (2008).** Biofilm development with an emphasis on Bacillus subtilis:322:1-16.doi: 10.1007/978-3-540-7541

*L*

- ✚ **Lamuela-Raventós R. M. (2017).** Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications*. Sous la dir .de Resat Apak Esra Capanoglu Fereidoon Shahidi. American, John Wiley & Sons Ltd, 107-115 pp. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>.
- ✚ **Liu.Z., Zhang.Z., Du.X, Liu.Y. (2023).** Formulation of a novel anti-lung cancer drug: Vanadium nanoparticles containing *Salvia officinalis*. *Inorganic Chemistry Communications*, 150 : 110520.

### *M*

- ✚ **Macheix.J.J., Fleuriet.A., Sarni-Manchado.P. (2006).** Les Polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec et Doc, Paris. France. PP : 1-28.
- ✚ **Macheix.J.J., Fleuriet.A., Sarni-Manchado.P. (2006).** Les Polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec et Doc, Paris. France. PP : 1-28.
- ✚ **Mahmoudi Souhila., Mustapha Khali., et Nacera Mahmoudi (2013).** "Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus L.*)" *Nature & Technology* 9 : 35.
- ✚ **Majeed .F., Hira .M., Robina .R., Talha .M.(2019).**Antimicrobial, cytotoxicity, mutagenicity and anti-epileptic potential of ethanol extracts of a multipurpose medicinal plant *Dalbergia sissoo*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.10.1155>.
- ✚ **Martins, N.(2012).** *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio* spp. *Jornal of Food Control*.
- ✚ **Mazari K., Bendinerad N., Benkhechi Ch., Fernandez X. (2010).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from Algerian *Juniperus phoenicea L* and *Cupressus sempervirens*. *Medicinal Plants Research*, 4(10): 959-964.
- ✚ **Miller R.E, McConville M.J.(2006), Woodrow I.E-**Cyanogenic glycosides from the rare Australian endemic rainforest tree *Clerodendrum grayi* (Lamiaceae)-*Phytochemistry*; 67; pp 43- 51
- ✚ **Mohsenipour Zeinab, Hassanshahian Mehdi. (2015).** The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. *Avicenna J Phytomed*, 5(4):309-18.

- ✚ **Mokhtari Raziye, Fard Mohammad Kazemi, Rezaei Mansour, Moftakharzadeh Seyed Adel, and Mohsen Amir.(2023).** Antioxidant, Antimicrobial Activities, and Characterization of Phenolic Compounds of Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), and Thyme–Sage Mixture Extracts. *Journal of Food Quality*, 9: 1-6. [.pageshttps://doi.org/10.1155/2023/2602454](https://doi.org/10.1155/2023/2602454)
- ✚ **Mujeeb F., Bajpai P., Pathak N. (2014).** Phytochemical Evaluation, Antimicrobial Activity, and Determination of Bioactive Components from Leaves of *Aegle marmelos*. *Biomed research international*, 2014: 1-11, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/497606>.

*N*

- ✚ **Naghibi F., Mosaddegh M., Mohammadimotamed M., Ghorbani A. (2005).** Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2: 63-79.
- ✚ **Noudogbessi J. P. A., Natta K A., Tchobo F. P., Bogninou G. S., Bothon F. T. D., Bossou A. D., Figueredo G., Chalard P., Chalchat J. C., Sohounhloué D, C. K. (2013).** Phytochemical screening of *Pentadesma butyracea* sabine (clusiaceae) acclimated in benin by gc/ms. *ISRN Analytical Chemistry*, 2013: 1-7, <https://dx.doi.org/10.1155/2013/172397>.

- ✚ **Noudogbessi.P., Alitonou.,G., Djenontin.S.T., Figueredo.G.(2013).** Chemical Compositions and Physico-chemical Properties of Three Varieties Essential oils of *Cymbopogon giganteus* Growing to the Spontaneous State in Benin. *Oriental Journal Of Chemistry* 29(1):59-67. DOI:10.13005/ojc/290109.

*O*

- ✚ **Obeizi.Z., Benbouzid.H., Djahoudi.A. (2020).** Evaluation de l'activité antibactérienne et antibiofilm des nanoparticules de dioxyde d'étain (Sn O<sub>2</sub>). *Journal of advanced research in science and technologie*, 7(2) : 22-34.
- ✚ **Olawuwo.O.S, Famuyide.I.M., Lyndy.J., Gaw.M.C. (2022).** Antibacterial and Antibiofilm Activity of Selected Medicinal Plant Leaf Extracts Against Pathogens Implicated in Poultry Diseases. *Frontiers in Veterinary Science*, 9: 820304.

- ✚ **Oliveira Jonatas Rafael, Viegas Daiane de Jesus, Martins Ana Paula Réquia, Carvalho Cláudio Antonio Talge, Soares Cristina Pacheco, Camargo Samira Esteves Afonso, Jorge Antonio Olavo Cardoso, Oliveira Luciane Dias. (2017).** Thymus vulgaris L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. *Archives of Oral Biology*, 82: 271–279
- ✚ **Olusola A.O., Elekan A.O., Olusola A.O., Ogidan T.O., Ekun O.E., Onoagbe I.O. (2020).** Evaluation of in vitro antioxidant activity of saponin-rich fraction from leaves of *Zanthoxylum zanthoxyloides*. *Environmental and Experimental Biology*, 18: 175–181.[http:// doi.org/10.22364/eeb.18.18](http://doi.org/10.22364/eeb.18.18)
- ✚ **OMS (Organisation Mondiale de la Santé), (2020),** Réglementation des médicaments à base de plantes : La situation dans le monde. WHO/TRM/98.1, Genève, Suisse, 65p

### P

- ✚ **Pandey.S.(2015).** Preliminary phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of *Bauhinia variegata* Linn. against human pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. Volume 5, Issue 2 P123-129. DOI :[https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60639-3](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60639-3)
- ✚ **Pereira.E., Barros.L., Antonio.A.L., Verde.S.C., Buelga.S.C., Ferreir.I.C.F.R.(2016).** Infusions from *Thymus vulgaris* L. treated at different gamma radiation doses: Effects on antioxidant activity and phenolic composition. *Journal of Functional Foods*. P 34-39.DOI : <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.027>
- ✚ **Prinzi.A.,Rohde R., Ph.D.(2023).** The Role of Bacterial Biofilms in Antimicrobial Resistance.*Journal American society of microbiologie*. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1).
- ✚ **POP Carmen R., Bogdan RUSU, Ancuța M. ROTAR, Liana SALANȚĂ, Alina L. NISTOR, Maria Simona CHIȘ, Teodora COLDEA. (2020).** Effect of preservation methods on the bioactive compounds of *thymus vulgaris*. *Hop and Medicinal Plants*, 1(2) : 237- 245.

### Q

- ✚ QURESHI .W., SAEED.F., AJAZ.M., AJAZ .M.R.(2022). In vitro antimicrobial, antibiofilm and antiphage activity of Thym ( Thymus vulgaris) Pak. J. Bot., 54(3). DOI : [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2022-3\(43\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2022-3(43)).

### R

- ✚ Rabai.M., Bouteldja.R., Doucene.R., Aggad.H.( 2021). *lupines albus* seeds extracts: phytochemical screening and antibacterial activity. *Lucrari stiintifice medicina veterinara* vol. Liv (2), Timisoara.
- ✚ Ramchoun M., Harnafi H., Alem C., Benlyas M., Elrhaffari L., Amrani S. (2009). Study on antioxidant and hypolipidemic effects of polyphenol-rich extracts from Thymus vulgaris and Lavendula multifida. *Pharmacognosy Research*, 1(3): 106-112.
- ✚ Rasteiro, V.C.(2014). Anti-biofilm and antibacterial effects of Thymus vulgaris essential oil alone and in combination with antibiotics against Staphylococcus aureus. *Journal of Medical Microbiology*.
- ✚ RathodNikheelBhojraj, ElabedNariman, PuniaSneh, OzogulFatih, Kim Se-Kwon, and Rocha João Miguel. (2023). Recent Developments in Polyphenol Applications on Human Health: A Review with Current Knowledge. *Plants*, 12(1217): 1-30. <https://doi.org/10.3390/plants12061217>.

### S

- ✚ Safdar M. N., Kausar T., Jabbar S., Mumtaz A., Ahad K., Saddozai A.A. (2016). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 1-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>.
- ✚ Salah-Ud-Din, Awan AB, Arshad MM, Haque A. (2022). Level of biofilm production by Staphylococcus aureus isolates is critical for resistance against most but not all antimicrobial drugs. *Pak J Med Sci*, 38(8):2150-2155. doi: 10.12669/pjms.38.8.6276.
- ✚ Sauer.K., Stoodley.P., Goeres.D.M., Hall-Stoodley.L, Burmølle.M., Stewart.P.S., Thomas.B. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20 : 608–620.

- ✚ **Selim Yasser A., Helmy Hany, E. Hamed Mennat-allah, Abdel-latif Nehal.(2023).** Chemical and biological studies of Thyme based on different solvents extraction. *Egyptian Journal of Chemistry*,66 (6) : 247 – 253.
- ✚ **Sharma Satish , Mohler James , Mahajan Supriya , Schwartz Stanley , Bruggemann Liana and Aalinkeel Ravikumar . (2023).** Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms*, 11(6), 1614; <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614>.
- ✚ **Silva, F. (2017).**Composition, antimicrobial, antioxidant, and anti-biofilm activities of essential oils from *Thymus vulgaris*, *T. zygis*, and *T. citriodorus*. *Journal of Essential Oil Research*. 19(7):681-687  
DOI:[10.1016/j.foodcont.2007.07.007](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.007)
- ✚ **Singh, G. (2007).** Chemistry of terpenoids and carotenoids.1er Ed. Discovery: India
- ✚ **Sofy.A.R., Aboseidah.A.A., El\_morsi.E., Ahmed., Azmy.H. (2021).** Évaluation if antibacterial and antibiofilm activity of new antimicrobials as an urgent need to countract stubborn multidrug\_resistant Bacteria. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(1) : 595-608. Volume 117,
- ✚ **Soni A., Sosa S. (2013).** Phytochemical Analysis and Free Radical Scavenging Potential of Herbal and Medicinal Plant Extracts. *Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 (4): 22-29.
- ✚ **Sultan. A. M., Nabel.Y.(2019).** Tube method and Congo red agar versus tissue culture plate method for detection of biofilm production by uropathogens isolated from midstream urine: Which one could be better?. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. Vol. 20 No. 1. DOI:10.4314/ajcem.v20i1.9.

*T*

- ✚ **Talaro., Kathleen., Park. (2008).** Foundation in Microbiology: Basic Principles, McGraw-Hill, New York. P 534.
- ✚ **Tirzitis G., Bartosz G. (2010).** Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Review Acta Biochimica Polonica*, 57(1): 139–142.

- ✚ **Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G., Kaur H. (2011).** Phytochemical screening and extraction: A review. *International Pharmaceutical Sciences*, 1(1):98-106.

### U

- ✚ **Usun Jones, S., Kee, B. P., Chew, C. H., Yeo, C. C., Abdullah, F. H., Othman, N., Puah, S. M. (2022).** Phenotypic and molecular detection of biofilm formation in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Malaysia. *Journal of Taibah University for Science*, 16(1), 1142–1150. <https://doi.org/10.1080/16583655.2022.2147387>.

### V

- ✚ **Vergun Olena, Svydenko Liudmyla, Grygorieva Olga, Sedláčková Vladimíra Horčinová, Šramková Katarína Fatrcová, Ivanišová Eva, Brindza Ján. (2022).** Polyphenol component and antioxidant activity of *Thymus* spp. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 16: 1-14. <https://doi.org/10.5219/1715>.

### W

- ✚ **Wijesundaraa.N.M., VasanthaRupasinghec.H.P. (2019).** Bactericidal and Anti-Biofilm Activity of Ethanol Extracts Derived from Selected Medicinal Plants against *Streptococcus pyogenes* , *Food Chemistry and Microbiology in Relation to Health* 24(6), 1165; DOI : <https://doi.org/10.3390/molecules24061165>.
- Yan Zhaoming, Zhong Yinzha, Duan Yehui, Chen Qinghua, LiFengna.(2020).** Antioxidant Mechanism of Tea Polyphenols and Its Impact on Health Benefits. *Animal Nutrition*, 6 (2): 115–123.

### Y

- ✚ **Yannick.D.N., Tremblay., Skander.H., Mario.J. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 78 :110–116.
- ✚ **Yassin Mohamed Taha Mostafa, Ashraf Abdel-Fattah, Al-Askar Abdulaziz Abdulrahman, Sayed Shaban R.M. (2022).** In vitro antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* extracts against some nosocomial and food poisoning bacterial strains. *Process Biochemistry*, 115, 152-159, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.02.002>.

- ✚ **Yekhlif.G.,Laroui.S.,Hambaba.L.,Aberkane.M.C.,Ayachi.A.(2011).**Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie* 9:209-218 DOI :<https://doi.org/10.1007/s10298-011-0641-6>.

### Z

- ✚ **Zeghad.N., Merghem R. (2013).** Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus Vulgaris* L. ROM. J. BIOL. – PLANT BIOL, 58 (1): 27–36.



# *Annexes*

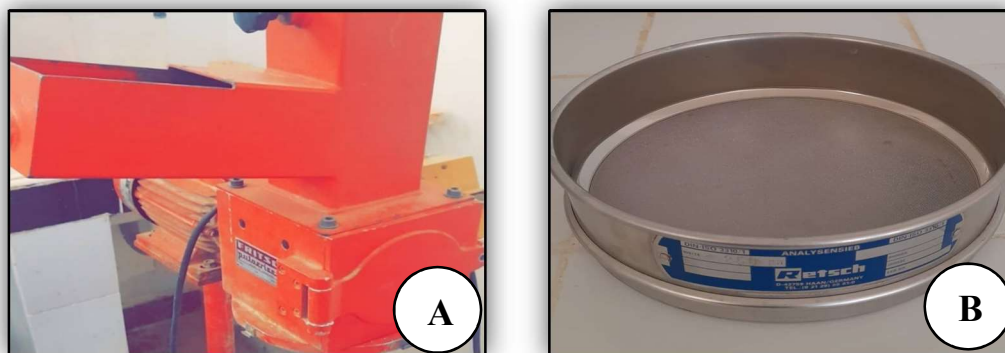


Figure N° 01 : A) Broyeur, B) Tamis.



Figure N° 02 : La poudre de *Thymus vulgaris* broyée et tamisée.

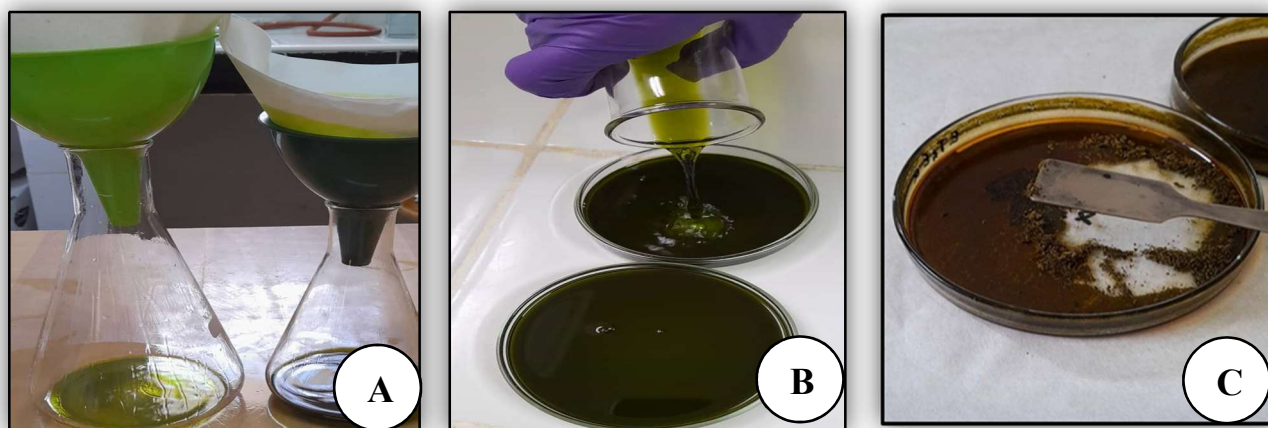


Figure N° 03 : A) Filtration , B) Évaporation .C) Grattage .

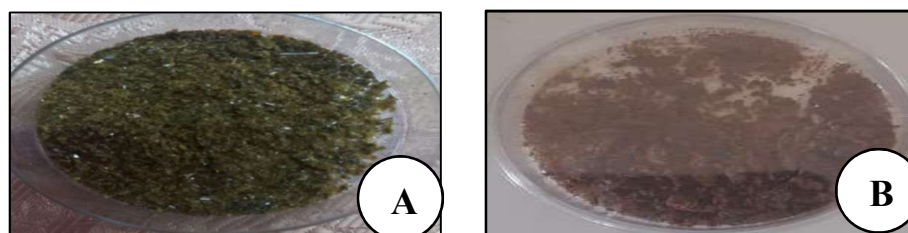
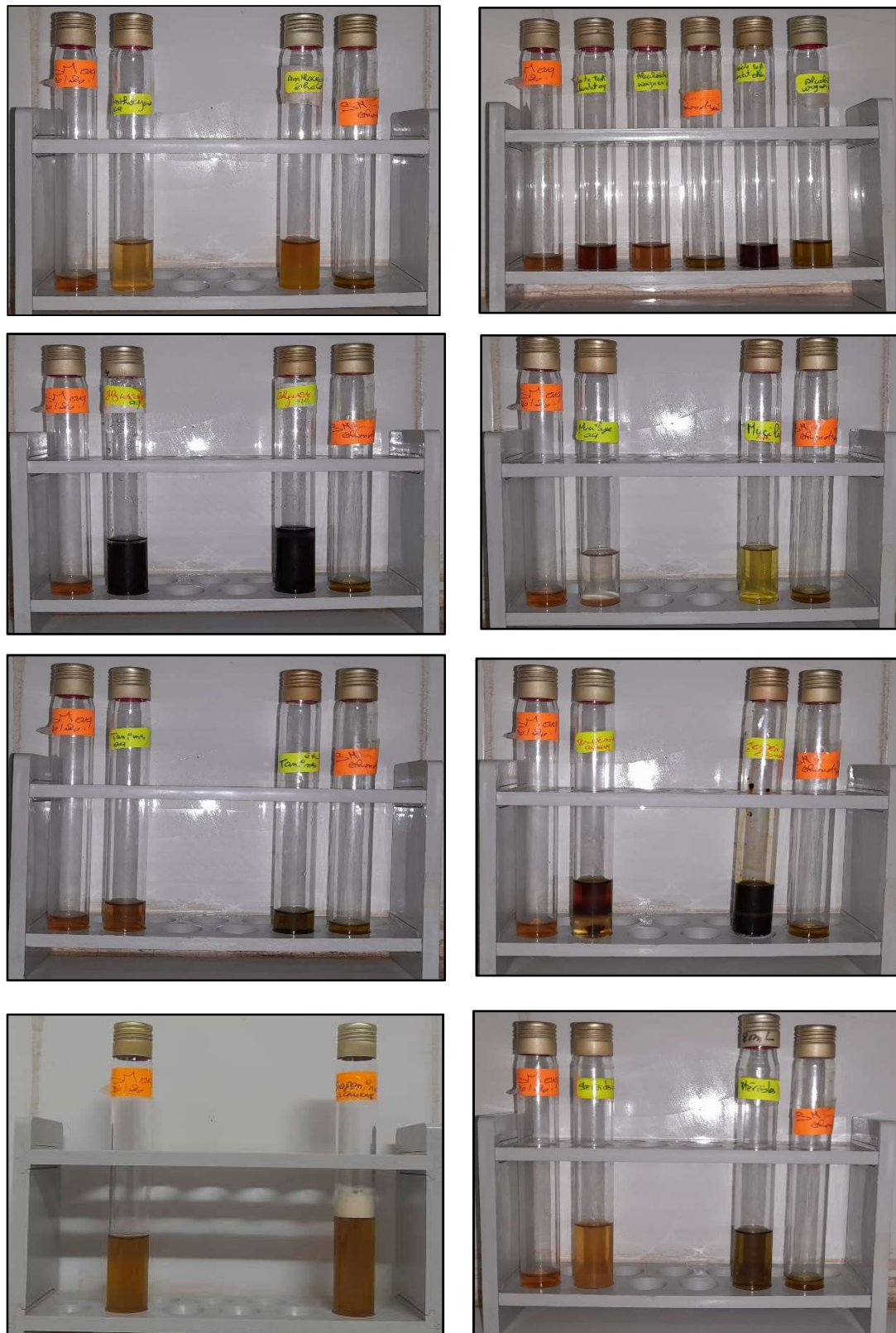


Figure N° 04: Résidu sec de l'extrait hydroéthanolique et l'extrait aqueux.



**Figure N °05:** Screening phytochimique des extraits aqueux et éthanolique 80% de *T.vulgaris* .

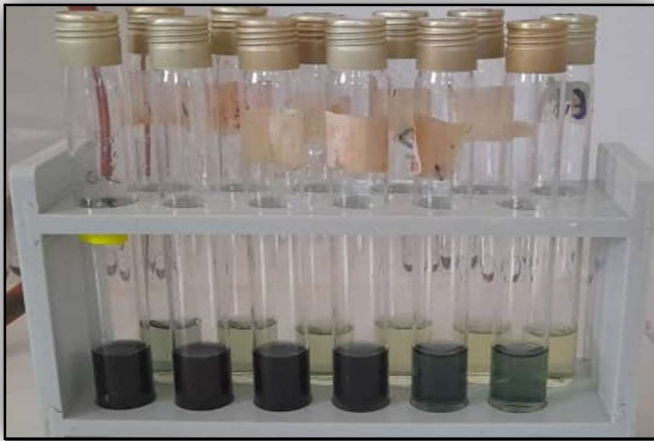


Figure N °06: Dosage des Polyphénols totaux

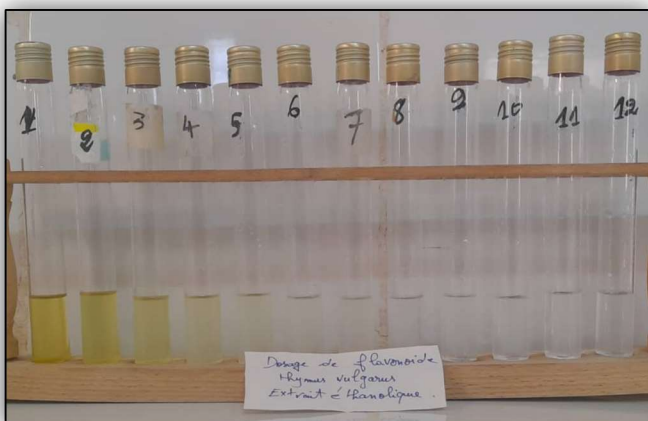


Figure N °07: Dosages des Flavonoïdes .

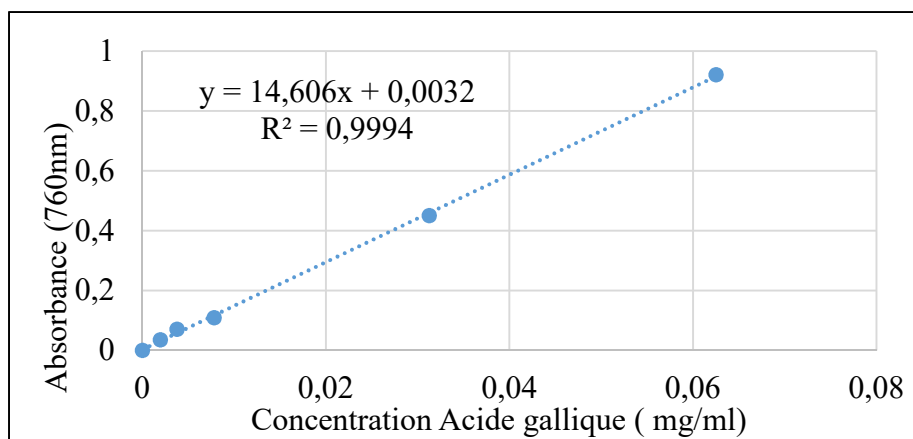


Figure N °08 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique .

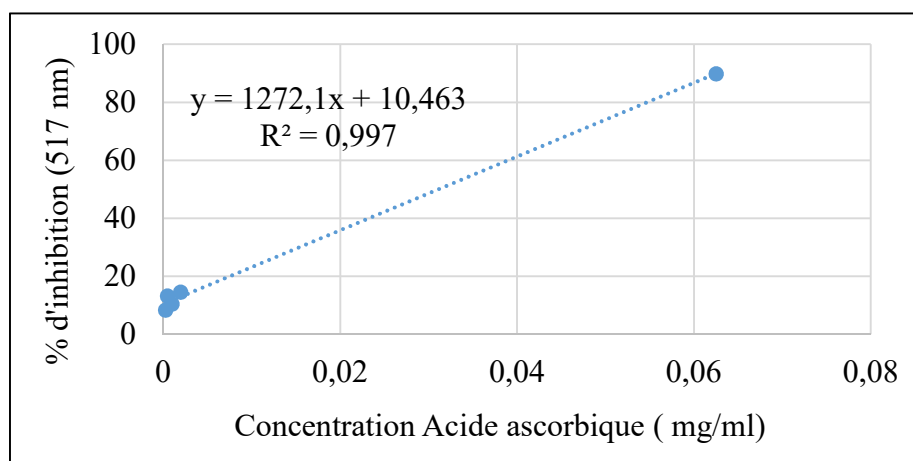


Figure N °09 : Courbe d'étalonnage d'acide Ascorbique .

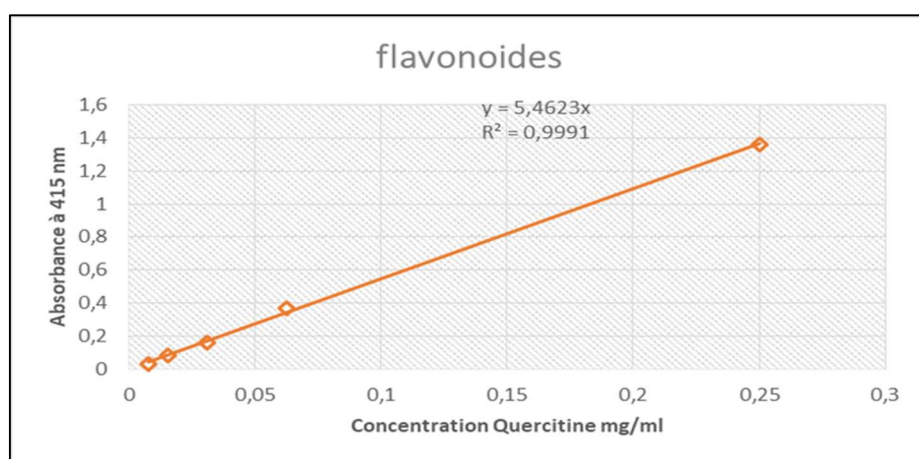
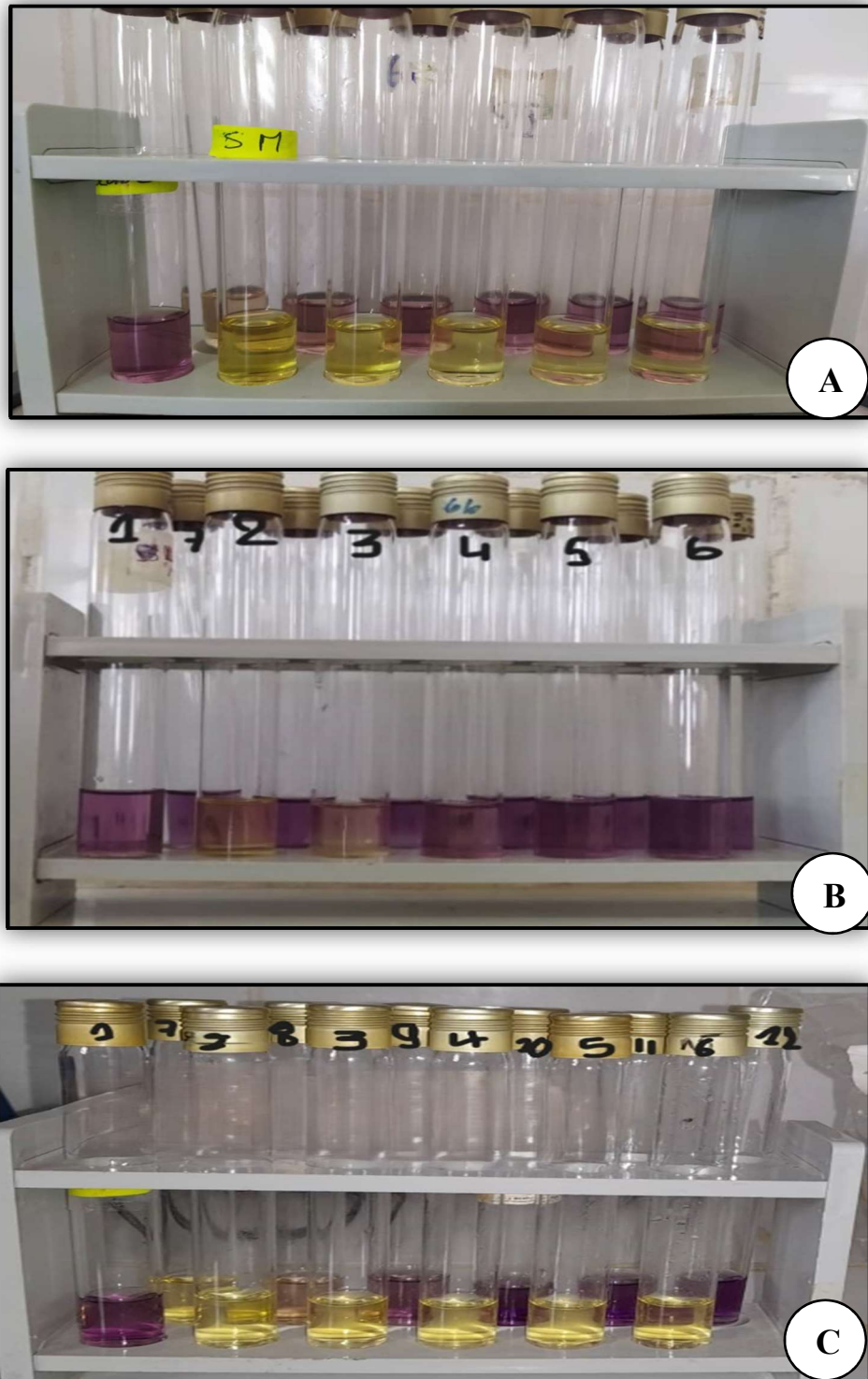


Figure N °10 : Courbe d'étalonnage de la Quercétine.



**Figure N °11 : Activité antioxydante par méthode DPPH .**

A :Extrait éthanolique 80%.    B : Extrait aqueux.    C : Acide Ascorbique.



Figure N °12 : Aspect microscopique de *Staphylococcus aureus* .



Figure N °13 : Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* .

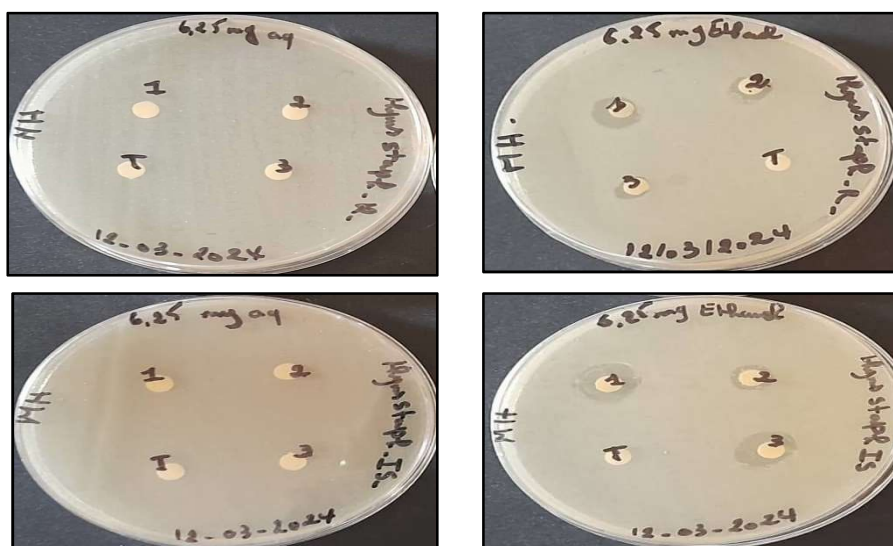


Figure N °14 : Activité antibactérienne des extraits aqueux et éthanolique à 80% de *T.vulgaris*.



Figure N °15 : Couler les boites avec gélose Rouge Congo .



Figure N °16 : L'ajout d'extrait sur la souche après 5j d'incubation .



Figure N °17 : Traitement avec Cristal Violet.



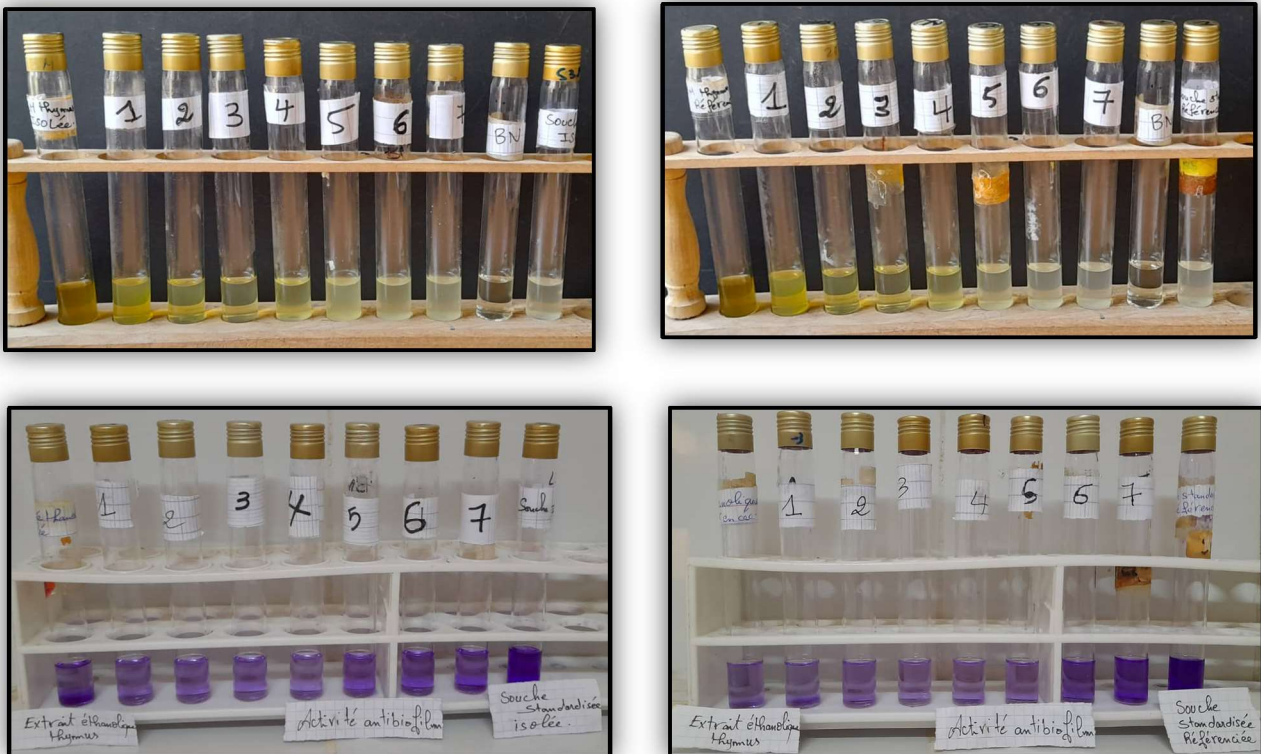


Figure N °18 : Inhibition de l'extrait hydroéthanolique de *T.vulgaris* de formation de biofilm formé par *S.aureus* I et R

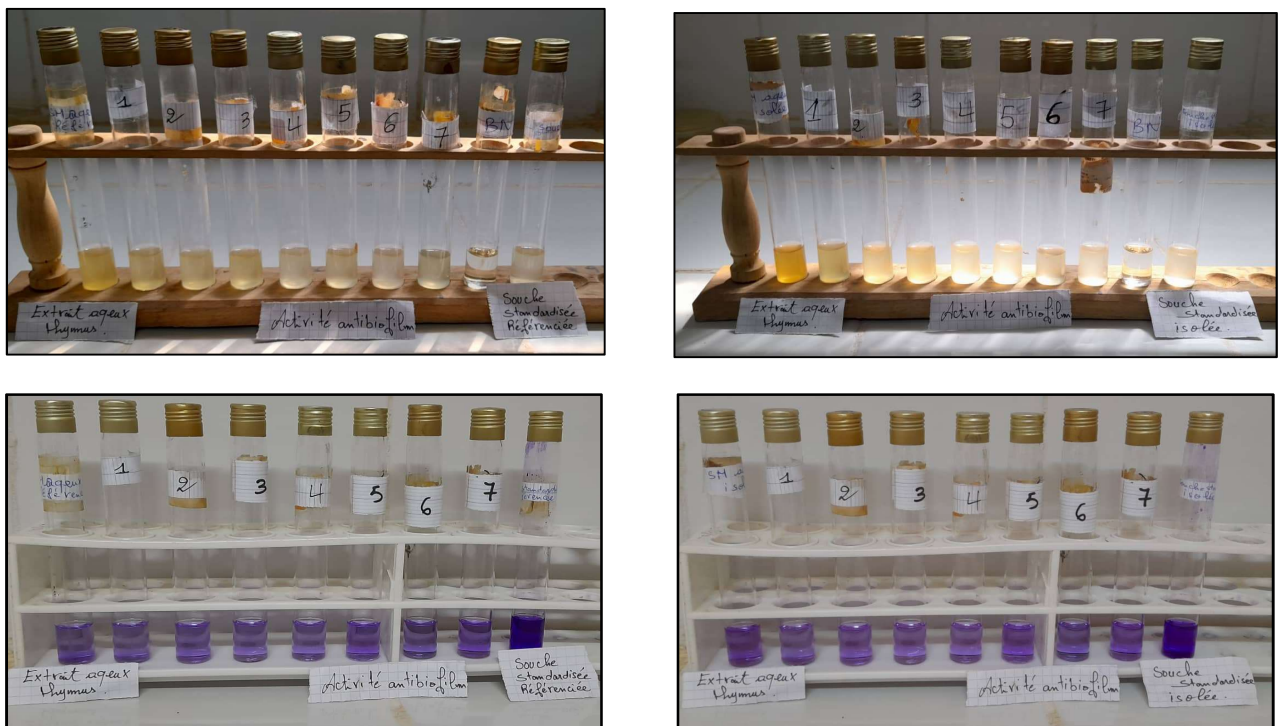


Figure N °19 :Pouvoir antibiofilm de l'extrait aqueux de *T.vulgaris* vis-à-vis *S.aureus* I et R .

## Milieux de culture liquides

### ➤ Bouillon nutritif

Peptone.....	15,0 g
Extrait de levure.....	3,0 g
Chlorure de sodium.....	6,0 g
D(-) glucose.....	1,0 g
Eau distillée.....	1000 ml

## Milieux de culture solides

### ➤ Gélose nutritive

Peptone.....	15 g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	02g
Chlorure de sodium.....	05g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 6,8 ± 0,2 à 25 °C.

Stérilisation à l'autoclave à 121± 1 °C pendant 15 minutes.

### ➤ Gélose Chapman

Extrait de viande (bovin au porcine).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcine).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g

pH=7,6

### ➤ Gélose Muller Hinton

Peptone .....	10g
---------------	-----

Extrait de levure .....	05g
Chlorure de sodium.....	05g
Glucose.....	01g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

pH non précisé ajouté à 7,0.

Stérilisation à l'autoclave à 118 °C pendant 15 minutes.

➤ **Rouge Congo Agar**

Eau distillée.....	100ml
Agar.....	3.7g
Rouge Congo.....	0,08g
Saccharose .....	5g

pH=6,8-7,4

➤ Réactif de Bouchard (**Chenni. 2010**):

Iode.....	02g
Iodure de potassium .....	02g
Eau distillé.....	100ml

➤ **Eau physiologique**

Eau distillée.....	1000ml
Nacl : .....	9 g