

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Ibn Khaldoun –Tiaret -
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Toxicologie et sécurité alimentaire

Présenté par

*ATTIA Dounya
*ATTIA Khadidja
* BENCHIKH Hafidha

Thème

Étude de l'effet antibactérien de *Thymus lanceolatus* Desf.

Soutenu publiquement le 04/07/2019

Membres du jury :

Grade

Présidente	R. BELMOKHTAR	MAA	Faculté SNV Tiaret
Examinatrice	H. KHADEM	MAA	Faculté SNV Tiaret
Promotrice	A.MILIANI	MAA	Faculté SNV Tiaret

Année universitaire : 2018-2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
مَنْ كَفَرَ بِاللَّهِ مِنْ بَعْدِ إِيمَانِهِ
سَاءَ مَا يَحْكُمُ اللَّهُ لَهُ

1420
سنة 1420
م

R emerciements

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à **Dieu** qui nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont à madame **MILLIANI Asmaa** pour ses conseils, ses encouragements, sa patience sa compétence et sa gentillesse qui nous ont permis de bien mener ce travail. Le suivi et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.*

*Nous tenons à exprimer notre très grande considération à madame **KHADEM H** et madame **BELMOKHTAR R** d'avoir accepté de juger ce travail.*

Un grand MERCI à toute l'équipe du laboratoire de la faculté de science de la nature et de la vie pour sincères collaboration scientifique et leurs encouragements.

A travers ce modeste travail, on tient à remercier l'ensemble des enseignants qui ont contribué de près ou de loin à notre formation, qu'ils retrouvent à travers ces lignes l'expression notre grande reconnaissance.

Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

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

**A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

**A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*

**A ma très chères sœurs: Ikram, Amina, Soumia , Rabia ,KHadidja et Fatima.*

**A mon frère : Abdelbasset.*

**A mes cousins(es), oncles, tantes*

**A toutes mes amies*

A toute la promotion de toxicologie et sécurité alimentaire 2018/2019.

AtiaDounya

Dédicaces

A mes très chers parents, sans eux je n'ai pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amour et leurs encouragements durant toute ma vie, Je ne trouve pas les mots pour traduire tout ce que je ressens envers des parents exceptionnels dont j'ai la fierté d'être la fille.

A mes très chères sœurs avec qui j'ai partagé les bons et les durs moments : Ikram, Amina, Soumia ,Rabia, Dounya et Fatima

A mon très cher frère Abdelbasset et à toute ma famille.

A tous ceux qui m'ont encouragé et m'ont Apporté leur soutien.

AtiaKhadidja

Dédicaces

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

Je le dédie à toutes personnes qui me sont chère ;

Au deux être les plus chers au monde qui ont donnés sens à mon existence, et qui m'ont soutenu nuits et jours durant tout mon parcours.

Ma très chère mère qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, je lui serai éternellement reconnaissante, merci maman.

Mon très cher père qui m'a donné un magnifique modèle de volonté, merci papa, Avec mes prières qu'ils soient toujours en bonne santé.

A ma grand- mère : Fadhila

A mes très chers frères : Ahmed et Mohamed

A mes très chères sœurs : Houaria et Douaa

A mes cousins(es), oncles, tantes.

A mes amies

A toute la promotion de toxicologie et sécurité alimentaire 2018/2019.

A tous ceux qui me sont chers ...

Benchikh Hafidha

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

CHAPITRE 1: Synthèse bibliographique

1.1. L'historique de Thym	3
1.2. Répartition géographique.....	3
1.2.1. Dans le monde	3
1.2.2. En Algérie	3
1.3. Caractéristiques botaniques de <i>Thymus lanceolatus</i> Desf	4
1.4. Classification botanique.....	4
1.5. Propriétés thérapeutiques du Thym	5
6. Principes actifs du Thym	5
6.1. Phénols.....	6
6.2. Saponosides.....	6
6.3. Tanins.....	6
6.4. Coumarines.....	6
6.5. Quinones libres.....	7
6.6. Flavonoïdes	7
6.7. Anthocyanes	7
6.8. Alcaloïdes.....	7
6.9. Huiles essentielles.....	8

CHAPITRE 2 : Matériel et Méthodes

2.1. Objectif du travail.....	9
2.2. Lieu et période d'étude	9
2.3. Matériel	11
2.3.1. Instruments et réactifs	11
2.3.2. Matériel biologique.....	11
2.3.2.1. Matériel végétal	11

2.3.2.2. Matériel microbiologique	11
2.4. Méthodes.....	11
2.4.2. Préparation des extraits	11
2.4.2.1. Extrait méthanolique	11
2.4.2.2. Extrait aqueux	12
2.4.2.3. Calcul du rendement en extraits	12
2.4.3. Extraction des huiles essentielles.....	12
2.4.4. Screening phytochimiques	13
2.4.4. 1. Recherche des polyphénols	13
2.4.4. 2. Recherche des saponosides.....	13
2.4.4. 3. Recherche des tanins	14
2.4.4. 4. Recherche des sucres réducteurs.....	14
2.4.4. 4. Recherche des coumarines	14
2.4.4. 5. Recherche des stéroïdes	14
2.4.4. 5. Recherche des quinones libres.....	15
2.4.4. 6. Recherche des flavonoïdes	15
2.4.4.7. Recherche des anthocyanes	15
2.4.4. 8. Recherche des alcaloïdes.....	15
2.4.5.Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits	16
2.4.5.1. Souches microbiennes étudiées	16
2.4.5.2. Revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes.....	16
2.4.5.3. Études des caractères morphologiques et biochimiques	17
2.4.5.4. Standardisation	17
2.4.5.5.Étude qualitative de l'activité antibactérienne des extraits	17
2.4.5.6. Étude quantitative de l'activité antibactérienne des extraits	18
2.4.5.7. Étude statistique.....	19

CHAPITRE 3 : Résultats et discussion

3.1. Rendements des extraits bruts	20
3.2. Caractéristiques organoleptiques des extraits	21
3.3. Screening phytochimique.....	21
3.4. Étude de l'activité antibactérienne de <i>Thymus lanceolatus</i> Desf	22
3.4.1. Vérification de la pureté des souches bactériennes	22
3.4.2. Étude qualitative de l'activité antibactérienne des extraits de <i>Thymus lanceolatus</i> Desf...23	

3.4.3. Étude quantitative de l'activité antibactérienne de l'HE de <i>Thymus lanceolatus</i> Desf.....	29
Conclusion et perspectives.....	33
Références bibliographiques	
Résumé	
Annexes	

Liste des figures

Figure 1 : <i>Thymus lanceolatus</i> Desf	4
Figure 2 : Protocole expérimental	10
Figure 3: <i>Thymus lanceolatus</i> Desf. Sèche (Originale)	11
Figure 4 : Montage d'hydrodistillation.....	12
Figure 5: Rendements en extraits (EM, EA, HE et HY)	21
Figure 6: Activité antibactérienne des extraits de <i>Thymus lanceolatus</i> et des antibiotiques vis-à-vis les souches bactériennes testées	24
Figure 7: Test de sensibilité aux extraits de la plante pour <i>S. aureus</i>	27
Figure 8 : Test de sensibilité aux extraits de la plante pour <i>B. cereus</i>	27
Figure 9 : Test de sensibilité aux extraits de la plante pour <i>B. subtilis</i>	28
Figure 10: Test de sensibilité aux antibiotiques Metronidazole (MTZ), oxacilline (OX) pour les souches bactériennes testées.	28
Figure 11: Concentrations minimales inhibitrices pour les souches bactériennes testées	31
Figure 12: Résultats de concentration minimale bactéricide (CMB) pour <i>S. aureus</i>	32
Figure 13: Résultats de concentration minimale bactéricide (CMB) pour <i>B. cereus</i>	32
Figure 14: Résultats de concentration minimale bactéricide (CMB) pour <i>B. subtilis</i>	32

Liste des tableaux

Tableau 1: Les souches bactériennes testées	16
Tableau 2: Propriétés organoleptiques des extraits	21
Tableau 3: Screening phytochimique de <i>Thymus lanceolatus</i> Desf.....	22
Tableau 4: Caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches bactériennes testées	23
Tableau 5: Diamètres de zones d'inhibitions des souches bactériennes étudiées.....	23
Tableau 6: Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB).....	29

Liste des abréviations

ATCC: American type culture collection.

B. cereus : *Bacillus cereus*.

B. subtilis : *Bacillus subtilis*.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CMB: Concentration minimale bactéricide.

EA: Extrait aqueux.

EM : Extrait méthanolique.

FeCl₃: Chlorure de fer (III).

Gram - : gram négative.

Gram + : gram positive.

HCl: Acide chlorhydrique.

HE: Huile essentielle.

HY: Hydrolat.

H₂SO₄: Acide sulfurique

MTZ: Métronidazole.

Na OH : Hydroxyde de sodium.

NH₄OH: Hydroxyde d'ammonium.

OX: Oxacilline.

PE: poids de l'extrait.

PHE: Poids de l'huile essentielle

PM : Poids de la matière végétale.

R : Rendement.

RHE: Rendement en huile essentielle.

S.aureus : *Staphylococcus aureus*.

Introduction

Depuis l'Antiquité et sur tous les continents, les plantes ont toujours tenu une place prépondérante dans l'art de guérir. Selon les cultures et les époques, elles ont été exploitées sous différentes formes, de diverses manières et pour les usages les plus variés (**Buronzo, 2008**).

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus (**Paul, 2001**).

Les hommes apprécient les vertus thérapeutiques des plantes. Ce qui a poussé les gens, à développer des utilisations et des connaissances sur les plantes médicinales et aromatiques. Ces plantes constituent une source de substances ayant des vertus thérapeutiques diverses, utilisées dans la pharmacopée traditionnelle de nombreux pays. Les produits naturels parmi lesquels les essences végétales issues de plantes médicinales sont une source prometteuse et un moyen efficace pour l'éradication des germes résistants aux antibiotiques puisqu'elles possèdent un réservoir de molécules anti-infectieuses importantes ayant des propriétés contre des bactéries (**Khadir et al. 2013**).

Le genre *Thymus* qui appartient à la famille des Lamiaceae, riche en espèces médicinales et aromatiques, fait partie des genres bien connus pour leurs propriétés pharmaceutiques, utilisées dans l'Antiquité comme médicaments antimicrobiens, antiseptiques, conservateurs alimentaires, arômes alimentaires et cosmétiques. Les espèces de thym ont donc une importance économique considérable (**Benbelaïd et al. 2013**). Il comprend une variété d'espèces dont une grande partie se situe dans la zone méditerranéenne. En Algérie, 12 espèces de *Thymus* colonisent le territoire du pays, Parmi elle *Thymus lanceolatus* Desf. (**khadir et al. 2013**).

Ce travail vise à étudier l'activité antibactérienne de différents extraits de *Thymus lanceolatus* Desf. et la caractérisation phytochimiques de cette plante.

Notre étude sera donc répartie en trois chapitres :

▀ Le premier chapitre présente une partie théorique sur les caractéristiques botaniques de *Thymus lanceolatus* Desf. , les principales utilisations de cette espèce ainsi que les différents éléments actifs contenus dans cette plante ;

- ▀ Le deuxième chapitre comporte le matériel utilisé et les méthodes suivies au cours de notre travail (préparation des extraits, extraction de l'huile essentielle, screening phytochimique et l'étude qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne de *Thymus lanceolatus* Desf.) ;
- ▀ Le troisième chapitre traite l'ensemble des résultats obtenus et leurs interprétations ;
- ▀ Enfin, nous avons terminés notre travail par une conclusion générale et des perspectives.

CHAPITRE 1

Synthèse bibliographique

1.1. L'historique de thym

Le nom « *Thymus* » dérive du mot grec « thymos » qui signifie « parfumer » à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (**Pariente, 2001**).

Le terme «Thym» est apparu dans la langue française au XIIe siècle. Il est dérivé du latin thymus qui l'a emprunté du grec « thumos » signifiant « grosseur ou loupe» (par référence à la glande, le thymus). D'autres pensent plutôt que le mot vient du grec « thymos » qui signifie «fumée», par allusion au fait qu'il était jadis brûlé comme encens et qu'on lui attribuait alors le pouvoir d'éloigner les créatures venimeuses. D'autres enfin, font dériver le mot du grec « thumus », qui signifie «courage», la plante étant jadis considérée comme revigorante (**Heni, 2015**).

Il semblerait que, pendant longtemps, le thym ait surtout été utilisé en médecine et dans les rituels religieux ou magiques, ses usages culinaires se limitant à aromatiser le fromage et les liqueurs. Les égyptiens s'en servaient pour embaumer leurs morts, les grecs pour parfumer les temples et l'eau des bains et les Romains pour purifier leurs appartements (**Heni, 2015**).

De nos jours, le thym est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne. Ses feuilles sont riches en huiles essentielles dont les propriétés sont mises à profit en phytothérapie et en médecine (**Kholkhal, 2014**).

1.2. Répartition géographique

1.2.1. Dans le monde

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées (**Naghbi et al. 2005**). Il existe plusieurs espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la Méditerranée. C'est une plante très répandue dans le nord ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye). Elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya (**Dob et al. 2006**).

1.2.2. En Algérie

Le thym est représenté par plus de 300 espèces à travers le monde dont 12 sont localisées en Algérie et 9 d'entre elles sont endémiques (**Quezel et Santa, 1962**). Ces espèces sont

réparties le long du territoire national, du Nord algérois à l'Atlas saharien, et du constantinois à l'oranais (Kabouche et al. 2005).

1.2. Caractéristique botanique de *Thymus lanceolatus* Desf.

Plante sous ligneuse de type vivace, à tige érigées. Les feuilles sont lancéolées de plus de 1 cm de longues. Le calice est finement pubescent. Les fleurs sont roses en inflorescences spiciformes allongées (Quezel et Santa, 1963).



Figure 1: *Thymus lanceolatus* Desf. originale

1.3. Classification botanique

D'après Quezel et Santa (1963), la classification qu'occupe *Thymus lanceolatus* Desf. dans la systématique est la suivante:

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement : Magnoliophyta

Sous-embranchement : Magnoliophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus lanceolatus*

1.4. Propriétés thérapeutiques du thym

Les espèces de thym sont parmi les assaisonnements les plus connus dans tous les pays. Elles sont généralement utilisées comme condiment culinaire et dans la préservation de plusieurs aliments (**Bauer et al. 1997**). Cette plante a aussi des applications importantes en médecine traditionnelle et représente récemment un sujet de recherche scientifique intéressant (**Ferhat, 2016**).

Dans la médecine traditionnelle algérienne, le thym a été utilisé comme expectorant, antitussif, anti-bronchiolite, antispasmodique, anthelminthique, carminatif, anti-infectieux, antidiabétique, antimicrobien et diurétique (**Khadir et al. 2013; Kabouche et al. 2005**). Il est également utilisé pour la préparation de tisanes et pour l'aromatisation et l'hygiène de la viande, en particulier la volaille (**Benbelaïd et al. 2013**).

Les espèces de thym sont fortement recommandées en raison d'une gamme de propriétés thérapeutiques de leur huile essentielle : anti hématologique, antiseptique et antimicrobien (**Nikolić et al. 2014; Rasooli et al. 2006**).

En outre, Les huiles essentielles et les extraits du genre *Thymus* sont utilisés en pharmacie, en cosmétique et en parfumerie (**Bauer et al. 1997 ; Ferhat, 2016**).

1.5. Principes actifs du Thym

Les végétaux supérieurs ont la capacité de synthétiser, par des voies métaboliques complexes, de nombreux composés qu'ils utilisent pour diverses fonctions adaptatives notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir (**Bougharara, 2016**). Parmi les quelles, les métabolites secondaires qui sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils y jouent différents rôles, dont celui de moyen de défense contre les agressions externes. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante (**Donatien, 2009**).

1.6.1. Phénols

Constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**). Ce sont des pigments généralement responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruit (jaune, orange, rouge). Ils sont présent partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux (**Edeas, 2007**).

Les phénols montrent des activités anti-inflammatoires et antiseptiques. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales (**Paul, 2001**).

1.6.2. Saponosides

Les saponines doivent leur nom au fait que, comme le savon, elles produisent de la mousse quand on les plonge dans l'eau. Ils sont généralement connus comme des composés non-volatils tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal. Ils manifestent des propriétés hémolytiques, antimicrobiennes, insecticides, molluscicides, anti-inflammatoires et antalgiques (**Vincken et al. 2007**).

1.6.3. Tanins

Les tanins sont des polyphénols polaires très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes et les dicotylédones. Ils sont caractérisés par leur capacité antioxydante. Les tanins permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Ils traitent également la diarrhée ou les irritations cutanées (**Achille, 1980 ; Kambouche et al. 2008**).

1.6.4. Coumarines

Sont des composés phénoliques constitués d'un benzène et des noyaux à pyrènes, les coumarines possèdent des propriétés physiologiques et antimicrobiennes. Les coumarines se trouvent dans nombreuse espèces végétales, et des substances naturelles organiques aromatiques (**Cowan, 1999**).

1.6.5. Quinones libres

Les quinones sont ubiquitaires et possèdent généralement des propriétés antimicrobiennes (**Kazmi et al. 1997**). Leurs principales cibles dans la cellule microbienne sont les andhésines, les polypeptides et les enzymes membranaires (**Aljabre, 2005**).

1.6.6. Flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Ils ont aussi des propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et antivirales (**Paul, 2001**).

1.6.7. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange (**Bessas et al. 2007**). Les anthocyanes sont des puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres Ils maintiennent une bonne circulation, notamment dans les régions du cœur, des mains, des pieds et des yeux.

1.6.8. Alcaloïdes

Sont des substances organiques azotées et basiques, d'origine végétale douée de propriétés physiologiques remarquable (toxiques ou thérapeutiques), telle que : La morphine (toxique) La quinine (thérapeutique). Ils sont aussi de forts agents antimicrobiens (**Claisse, 1993**).

1.6.9. Huiles essentielles

Les huiles essentielles appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont odorantes et très volatiles (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

Les huiles essentielles possèdent des propriétés antiseptiques, antibactériennes et antifongiques. Elles possèdent également des propriétés antivirales, anti-inflammatoires, cicatrisantes, circulatoires, digestives, antiparasitaires et antispasmodiques (**Buronzo, 2008**).

CHAPITRE 2

Matériel et Méthodes

2.1. Objectif du travail

Notre étude s'intègre dans le contexte plus global de la mise en valeur de la biodiversité des plantes aromatiques algériennes dont les objectifs principaux peuvent se résumer ainsi:

- Identification botanique de la plante.
- Préparation des extraits volatiles (huile essentielle et hydrolat) et non volatiles (extraits aqueux et méthanolique) de la partie aérienne de *Thymus lanceolatus* Desf. ;
- Etude phytochimique de *Thymus lanceolatus* Desf.;
- Évaluation « in vitro » de l'activité antibactérienne des extraits de *Thymus lanceolatus* Desf. vis-à-vis de trois souches bactériennes pathogènes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*) et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

2.2. Lieu et période d'étude

Notre étude expérimentale à été réalisée au niveau des laboratoires de Technologie Alimentaire et de Microbiologie, du département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université IBN Khaldoun de Tiaret. Nos essais expérimentaux se sont étalés sur une durée de deux mois et huit jours (10 février au 18 Avril 2019).

Le protocole expérimental suivi pour réaliser cette étude est mentionné dans la figure 2.

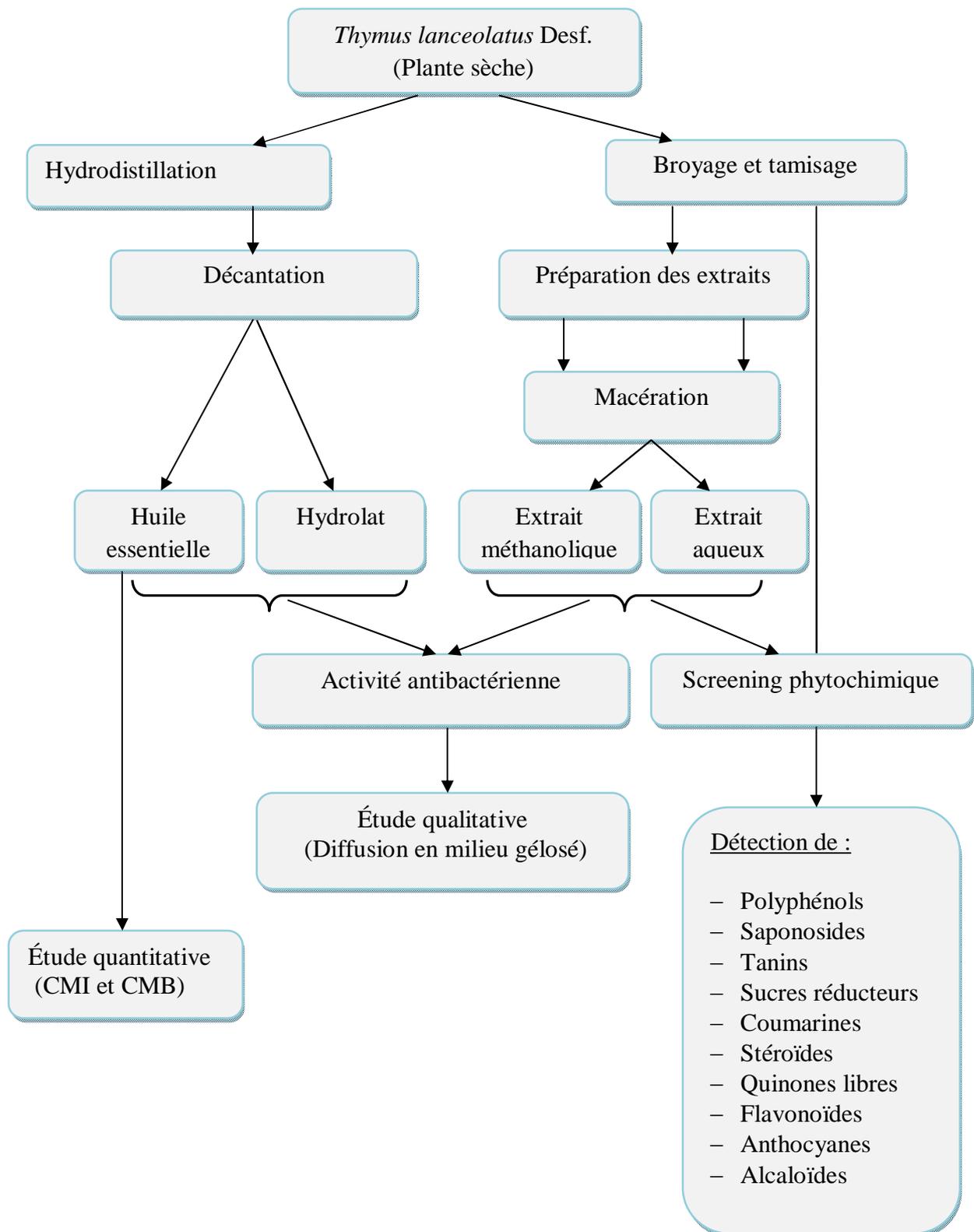


Figure 2: Protocole expérimental

2.3. Matériel

2.3.1. Instruments et réactifs : (Annexe A: Tableau A1)

2.3.2. Matériel biologique

2.3.2.1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur une plante aromatique *Thymus lanceolatus* Desf., communément appelée Zaater. La plante a été achetée au marché local de Tiaret. D'après l'herboriste la plante a été récoltée au mois de juillet dans la région de Mâchera SFA wilaya de Tiaret.

Les parties aériennes (feuilles et tiges) sont ensuite nettoyées, broyées à l'aide d'un broyeur électrique et conservées dans des flacons en verre à l'abri de la lumière et l'humidité pour des analyses ultérieures.



Figure 3 : *Thymus lanceolatus* Desf. Sèche (Originale)

2.3.2.2. Matériel microbiologique

L'activité antibactérienne de *Thymus lanceolatus* Desf. est effectuée sur trois souches bactériennes provenant du laboratoire de microbiologie de l'université IBN Khaldoun - TIARET- .

2.4. Méthodes

2.4.2. Préparation des extraits

2.4.2.1. Extrait méthanolique

Une prise d'essai de 50g de poudre de la plante a été mise à macérer dans 500 ml de méthanol absolu sous agitation magnétique pendant 24 heures. Après filtration, l'extrait a été évaporé à sec sous pression réduite à 50°C au Rotavapor (**Falleh et al. 2008**) (**Annexe B**).

2.4.2.2. Extrait aqueux

30 g de poudre de la plante dissous dans 450 ml d'eau distillée ont été chauffés à reflux pendant 2h, Après filtration à froid, ce filtrat a été ensuite séché dans une étuve à 50 °C pendant trois jours (Majhenic et al. 2007) (Annexe B).

2.4.2.3. Calcul du rendement en extraits

Le rendement de la plante en extraits est estimé par le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de matière végétale à traiter. Il est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R\% = PE / PMV. 100$$

Où

R(%) : le rendement en extraits en pourcentage (%) ;

PE: le poids de l'extrait en gramme (g) ;

PM : le poids de la matière végétale en gramme (g).

2.4.3. Extraction des huiles essentielles

Pour extraire les huiles essentielles de la plante, nous avons opté pour l'hydrodistillation. Le montage utilisé est présenté dans la figure 4.

Ce procédé consiste à porter à ébullition une quantité de 100 gde matériel végétal sèche pendant 3 à 4 heures avec 500 ml d'eau distillée dans un ballon de 500 ml. La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'hydrolat par décantation.



Figure 4: Montage d'hydrodistillation

Le rendement de l'huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée (**Sidali et al. 2014**). Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule:

$$\text{RHE}\% = \text{PHE} / \text{PMV} \cdot 100$$

Où

RHE(%) : le rendement en huile essentielle en pourcentage ;

PHE: le poids de l'huile essentielle en gramme (g) ;

PM : le poids de la matière végétale en gramme (g).

Les huiles essentielles récupérées sont conservées à 4°C dans des flacons stériles en verre brun, hermétiquement fermés et à l'abri de la lumière (**Sidali et al. 2014**).

2.4.4. Screening phytochimiques

C'est l'ensemble des tests qui consiste à détecter les différentes familles chimiques présentes dans la plante par réaction de précipitation ou coloration à l'aide de réactifs spécifiques à chaque famille de composés (**Benbelaïd et al. 2013**).

2.4.4. 1. Recherche des polyphénols

À 2 ml de chaque extrait (méthanolique et aqueux), ajouter une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée indique la présence de polyphénols (**N'guessan et al. 2009**).

2.4.4. 2. Recherche des saponosides

Dans un tube à essai 10 ml de chaque extrait est agité vigoureusement pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min, si la hauteur de la mousse persistante est supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides (**N'guessan et al. 2009**).

2.4.4. 3. Recherche des tanins

▮ Tanins catéchiques

5ml de chaque extrait ont été évaporés à sec. Après ajout de 15 ml du réactif de Stiasny au résidu, le mélange a été maintenu au bain-marie à 80°C pendant 30 min. L'observation d'un précipité a caractérisé les tanins catéchiques (N'guessan et al. 2009).

▮ Tanins galliques

Filtrer la solution précédente et saturer le filtrat avec 10 ml d'une solution d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl₃ provoquerait l'apparition d'une coloration bleu-noir intense, signe de la présence de tanins galliques (N'guessan et al. 2009).

2.4.4. 4. Recherche des sucres réducteurs

À 5 ml de chaque extrait sont additionnés 5 ml de liqueur de Fehling. La formation d'un précipité rouge brique après chauffage au bain-marie à 70°C indique une réaction positive (Yves et al. 2007).

2.4.4. 4. Recherche des coumarines

2 ml de l'extrait à 5% placé dans un tube dans lequel sont ajoutés 3 ml de NaOH (10%). Après agitation de la solution, l'apparition d'une couleur jaune indique la présence de coumarines (Diallo, 2000 ; Daira et al. 2016).

2.4.4. 5. Recherche des stéroïdes

Dans une capsule, on introduit 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml de l'extrait, qui sont repris dans un tube à essai dans lequel sont ajoutés 0,5 ml de H₂SO₄ concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive (Harborne, 1998; Daira et al. 2016).

2.4.4. 5. Recherche des quinones libres

1g de matériel végétal sec est broyé et placé dans un tube avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 h, les extraits sont filtrés et concentrés au rotavapeur.

La présence des quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH à 10%, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet (**Dohou, 2004; Daira et al. 2016**).

2.4.4. 6. Recherche des flavonoïdes

Macérer 2 g de la plante en poudre dans 40 ml de HCl (1%) pendant 24 h. Prendre 10 ml de filtrat, le rendre basique par l'ajoute d'une solution d NH₄OH. L'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure indique la présence des flavonoïdes (**Bouchouka, 2016**).

2.4.4.7. Recherche des anthocyanes

À 5 ml de chaque extrait, on ajoute 5 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) puis 5 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH). Une coloration rouge en milieu acide et bleue violacée en milieu basique témoigne de la présence d'anthocyanes (**Mibindzou, 2004**).

En présence de leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée, les catéchols donnent une teinte brune-rouge (**Mibindzou, 2004**).

2.4.4.8. Recherche des alcaloïdes

0,1 g de résidu est repris dans 6 ml d'éthanol à 60%, puis reparti dans 2 tubes à essai.

-Dans le premier tube, sont ajoutées 2 gouttes de réactif de Dragendorff (réactif à l'iodo-bismuthate de potassium). L'apparition d'un précipité rouge orangé ou brun - rougeâtre indique un test positif (**Yves et al. 2007**).

-Dans le deuxième tube, sont ajoutées 2 gouttes de réactif de Burchard (réactif iodo-ioduré). L'apparition d'un précipité brun indique un test positif (**Yves et al. 2007**).

2.4.5.Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits

2.4.5.1. Souches microbiennes étudiées

Pour évaluer le caractère antibactérien des extraits de *Thymus lanceolatus* Desf., nous avons utilisé trois souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* (tableau 1).

Tableau1 : Souches bactériennes testées

Souches de référence	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633

La gélose Mueller-Hinton a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des souches sélectionnées.

2.4.5.2. Revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes

La revivification a été réalisée sur des bouillons nutritifs, avec une incubation à 37°C pendant 18h. La purification consiste à réaliser des repiquages avec la méthode des stries sur gélose nutritive pour *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*, l'incubation est faite à 37°C pendant 24h (Delarras, 2007) (Annexe C).

2.4.5.3. Études des caractères morphologiques et biochimiques

La pureté des souches est confirmée par des examens macroscopiques et microscopiques et des tests biochimiques.

A. Étude de caractères morphologiques

■ **Caractérisation macroscopique:** En se basant sur l'observation à l'œil nu des colonies afin de déterminer l'aspect, la taille, la forme, et la couleur des colonies des cultures bactériennes obtenues sur gélose .

■ **Caractérisation microscopique:** L'examen microscopique a été effectué après coloration de Gram sur une culture jeune de 24h, elle permet de décrire la forme des cellules, leur mode d'association, après réalisation des frottis colorés (El amri et al. 2014) (Annexe C).

B. Étude de caractères biochimiques

Pour mettre en évidence la production de catalase, on prélève une colonie bien isolée, qu'on étale avec l'anse de platine sur une lame et on ajoute une goutte d'eau oxygénée à 10%. La présence de catalase se manifeste par une effervescence qui indique une formation de bulles d'air, dues à la dégradation de l'eau oxygénée (Marchal et al. 1982 ; Guiraud, 1998 ; Prescott, 2003) (Annexe C).

2.4.5.4. Standardisation

Cette étape consiste à la détermination de la concentration des cultures bactériennes exprimée par (UFC/ml) issus d'un ensemencement de 2 à 3 colonies des cultures fraîches de 24h/37°C. Selon la technique de Mac Farland, la densité optique de chaque cultures doit être comprise entre 0,08 et 0,13 à la longueur d'onde de 625 nm, ce qui correspond de 10^7 à 10^8 UFC / ml (Sidali et al. 2014).

2.4.5.5. Étude qualitative de l'activité antibactérienne des extraits

L'effet antibactérien des extraits de *Thymus* et des antibiotiques a été déterminé par la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier (Essawi et al. 2000).

A. Test de sensibilité aux extraits de la plante (Aromatogramme)

L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence c'est le remplacement des antibiotiques par des extraits aromatiques.

Des disques stériles de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés de 20 µl de différents extraits à tester. Les disques sont déposés à la surface de la gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24h (Roques et al. 2003) (Annexe C).

La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions (exprimés en mm). Chaque diamètre est représenté par la moyenne de deux mesures.

L'interprétation de nos résultats s'est faite par la comparaison avec ceux de l'échelle de mesure mises en place par **Ponce et al. (2003)**.

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20mm.

B. Test de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme)

Ce test a été réalisé pour étudier la sensibilité des germes utilisés et la comparer avec l'effet de nos extraits. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait (**Yakhlef et al. 2011**).

Les antibiotiques utilisés pour réaliser l'antibiogramme sont : Métronidazole (MTZ) et Oxacilline (OX).

2.4.5.6. Étude quantitative de l'activité antibactérienne des extraits

L'évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Thymus lanceolatus* Desf. consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

A. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de *Thymus*

La CMI a été déterminée par la méthode de dilution en gélose sur milieu de Mueller-Hinton. Cette technique consiste à inoculer, avec des disques bactériens, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03, 0.015, 0.007%). Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration

Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne (Denis et al. 2007).

B. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'huile essentielle de *Thymus*

La gélose de Muller-Hinton coulée dans des boîtes de pétri est inoculé avec des disques bactériens provenant des boîtes de pétri ayant une concentration \geq CMI dans la série de dilution précédente. La CMB est déterminée après une incubation de 24 heures à 37°C. C'est la plus petite concentration qui inhibe totalement la croissance. L'effet antibactérien a été jugé bactéricide ou bactériostatique en fonction du rapport : CMB/CMI. En effet, si CMB/CMI < 4, l'effet est bactéricide et si CMB/CMI \geq 4, l'effet est bactériostatique (Oussou, 2008).

2.4.6. Étude statistique

Pour valorisé nos résultats, nous avons procédé à l'analyse de la variance d'ANOVA. Cette méthode statistique permet de comparer les moyennes de plusieurs échantillons supposés indépendants à l'aide du logiciel SPSS 20 (Armonk, NY: IBM Corp). L'analyse de la variance est suivie par le Test de Student -Newman-Keuls qui permet de distinguer les groupes homogènes en comparant les probabilités de la manière suivante :

- Si $P > 0,05$: résultat non significatif.
- Si $p < 0,05$: résultat significatif

CHAPITRE 3

Résultats et discussion

3.1. Rendements des extraits bruts

Les deux extraits aqueux et méthanoliques ont été préparés à partir des parties aériennes du *Thymus lanceolatus* Desf. C'est une méthode d'extraction par macération dans des solvants polaires : l'eau et le méthanol.

Le rendement de l'extraction aqueuse (19,6%) est relativement supérieur à celui de l'extraction méthanolique (9%).

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous le contenu total en métabolites secondaires, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (Lee et al. 2003; Lee et al. 2005).

L'hydrodistillation de la partie aérienne de *Thymus lanceolatus* Desf. a donné un rendement en HE de 1.55%. Ce rendement en HE est relativement élevé comparé à ceux obtenus sur la même espèce originaire de Tlemcen (0.9%) (Khadir et al. 2013).

Ce rendement en HE reste supérieur à celui observé chez *Thymus vulgaris* (0.96%) *Thymus algeriensis* (0,3%) et *Thymus ciliatus* (1,2%) (El Ajjouri et al. 2010; Sidali et al. 2014).

La différence de rendements en huiles essentielles peut être expliquée, Ces fluctuations de rendements peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs notamment, l'origine de récolte, les facteurs génétiques, la position géographique, la nature du sol, les conditions climatiques, le temps et l'appareillage d'extraction (Amarti et al. 2011).

L'hydrolat issu de l'hydrodistillation présente un rendement élevé de l'ordre de 65,3 %.

Le rendement des extractions de la partie aérienne de *Thymus lanceolatus* Desf. sont illustrés dans la figure5.

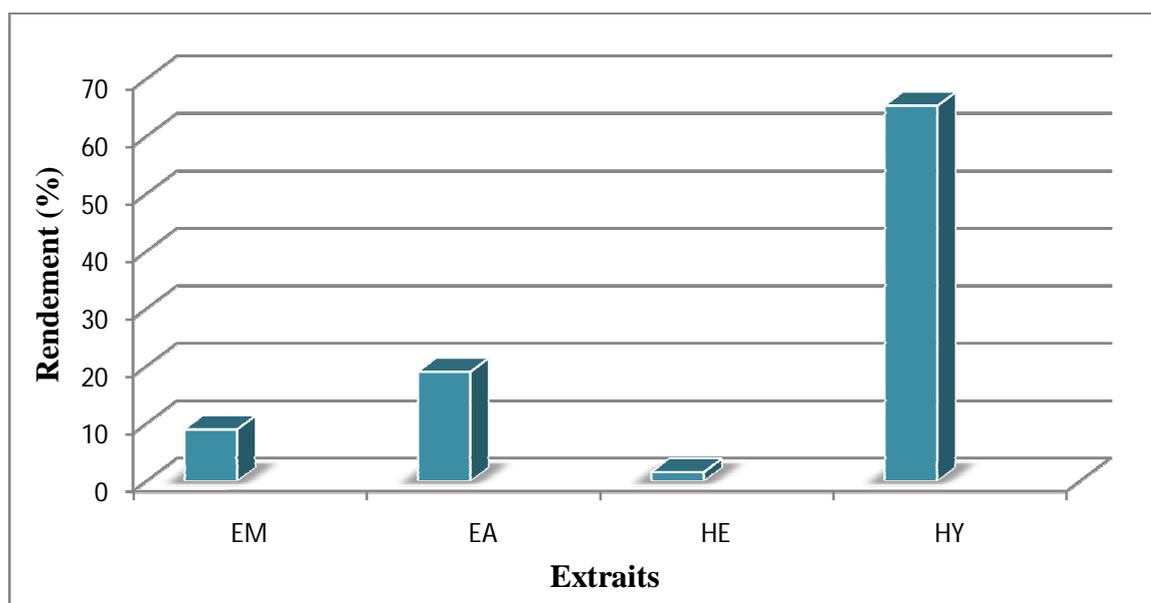


Figure 5 : Rendements en extraits (EM, EA, HE et HY)

3.2. Caractéristiques organoleptiques des extraits

Les caractéristiques organoleptiques des extraits sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2: Propriétés organoleptiques des extraits

Extraits	EM	EA	HE
Aspect	Pate collante	Poudre	Liquide limpide
Couleur	Vert foncé	Marron	Jaune
Odeur	Aromatique	Aromatique	Aromatique forte

3.3. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques permettent une identification de quelques groupes chimiques présents dans la plante.

Les résultats de ce criblage phytochimique sont reportés dans le tableau 3, il révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolites secondaires par des signes la présence (+), l'absence (-) (**Annexe B**).

Tableau 3 : Screening phytochimique de *Thymus lanceolatus* Desf.

Métabolites secondaires	Résultats des réactions en tube
Polyphénols	+
Saponosides	+
Tanins catéchiques	+
Tanins galliques	-
Sucres réducteurs	+
Coumarines	+
Stéroïdes	-
Quinones libres	+
Flavonoïdes	+
Anthocyanes	+
Alcaloïdes	+

Les travaux faites par **Benbelaïd et al (2013)** sur les tests phytochimiques de *Thymus lanceolatus* Dsef. Ont aussi démontré la présence des polyphénols, des saponines, des flavonoïdes et des tanins.

3.4. Étude de l'activité antibactérienne de *Thymus lanceolatus* Desf.

3.4.1. Vérification de la pureté des souches bactériennes

Les caractères morphologiques et biochimiques des colonies sont illustres dans le tableau 4, (Annexe C).

Tableau 4 : Caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches bactériennes testées

Bactéries	Caractéristiques morphologiques		Caractéristiques biochimiques
	Gram	Forme	Catalase
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Coques en grappe de raisin	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	Bâtonnets	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	Bâtonnets	+

3.4.2. Étude qualitative de l'activité antibactérienne des extraits de *Thymus lanceolatus* Desf.

L'activité antibactérienne des extraits de *Thymus lanceolatus* Desf. a été évaluée par la technique de diffusion sur un milieu gélosé (méthodes des disques) vis-à-vis de trois souches bactériennes après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié. Le Métronidazole (MTZ) et l'Oxaccilline (OX) ont servi de témoins positifs.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 5 et la figure 6.

Tableau 5 : Diamètres de zones d'inhibitions des souches bactériennes étudiées

Souches bactériennes	Diamètres de zones d'inhibitions en (mm) (moyenne ± écart-type)					
	EM (2%)	EA (2%)	HE (Pure)	HY (Pure)	MTZ (10 µg/ml)	OX (1µg/ml)
<i>S. aureus</i>	7,25±0,50	7,75±0,50	68,25±1,35	9,75±4,34	6,00±0,00	28,00±1,15
<i>B. cereus</i>	14,75±1,25	7,25±0,50	44,50±0,55	6,75±0,50	6,00±0,00	14,50±0,57
<i>B. subtilis</i>	8,87±0,85	8,87±0,25	51,50±5,06	8,12±0,25	7,00±0,00	7,25±0,28

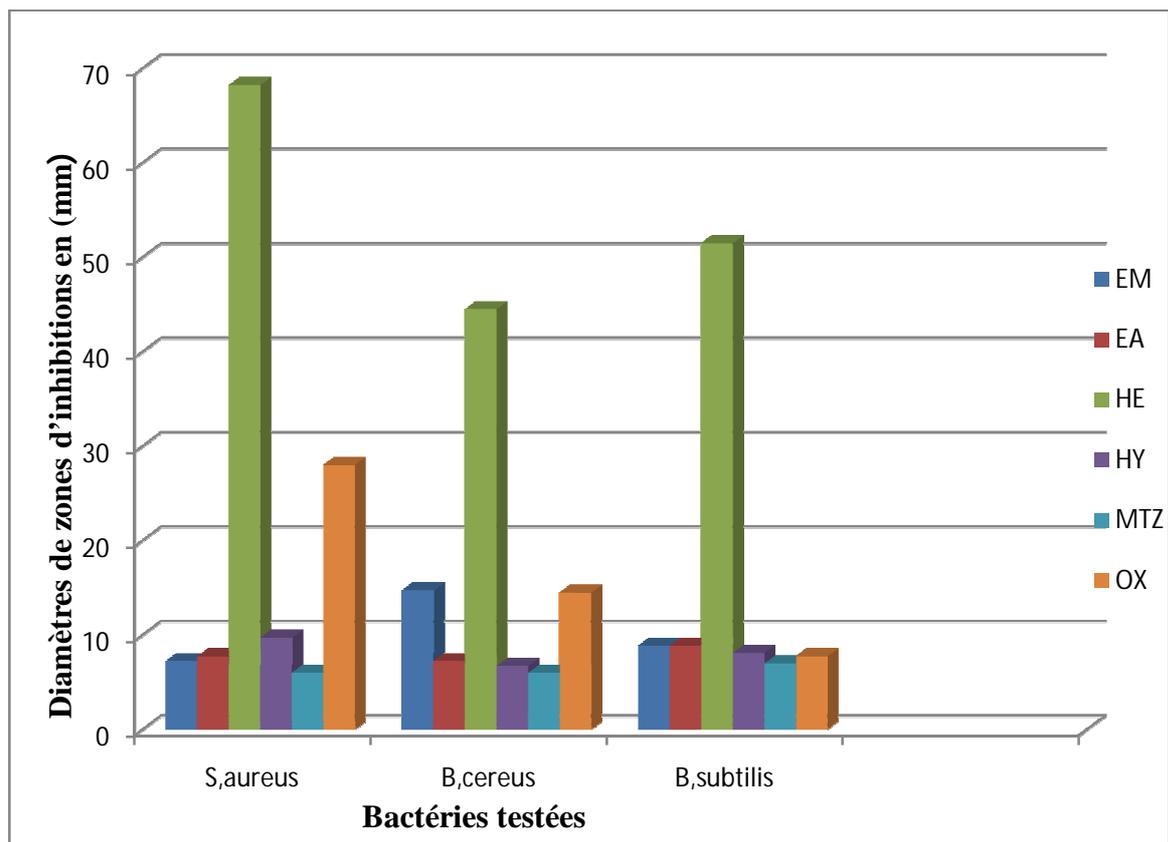


Figure 6 : Activité antibactérienne des extraits de *Thymus lanceolatus* et des antibiotiques vis-à-vis les souches bactériennes testées

D'après le test ANOVA ($p < 0,05$) (**Annexe D**), il y a une différence significative de l'effet des extraits sur les bactéries testés. Ainsi, Les souches bactériennes se comportent différemment vis-à-vis de tous les extraits.

L'huile essentielle de *Thymus lanceolatus* Desf. montre une activité antibactérienne importante sur toutes les souches testée. En prenant en considération les diamètres d'inhibition, l'HE est extrêmement active sur *Staphylococcus aureus* (figure 7), *Bacillus cereus* (figure 8) et *Bacillus subtilis* (figure 9) avec des diamètres d'inhibition respectivement de 68.25 mm, 44.5 mm et 51.5 mm.

L'évaluation de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Thymus lanceolatus* Desf. a permis d'affirmer les résultats obtenus par **Khadir et al (2013)**, où l'huile essentielle s'est avéré extrêmement efficace vis à vis les bactéries suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*.

Les bactéries à Gram positif, vue l'absence d' une couche fine de peptidoglycane et une membrane externe riche en phospholipide, et la faible teneur en phospholipides, permet le contact direct des constituants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, provoquant ainsi soit, une augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux, soit une déficience au niveau du système enzymatique (**Randrianarivelo et al. 2009; Zarai et al. 2011**).

Le diamètre moyen des zones d'inhibitions de l'huile essentielle testée [44,5 mm à 86,25 mm] sont meilleurs par rapport à ceux rapportés par certains auteurs dont les diamètres moyens des zones d'inhibition des huiles essentielles de plusieurs espèces de thym se situent dans un intervalle de [13,3mm à 35,6mm] (**Rasooli et al. 2002; Dob et al. 2006; Rota et al. 2008; Haddouchi et al. 2009**).

Il a été rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne semblent vraisemblablement être les composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol (**Khadir et al. 2013**).

L'extrait méthanolique montre une activité bactérienne modérée vis-à-vis *Bacillus cereus* avec un diamètre de zone d'inhibition est égale 14.75 mm, mais les deux autres bactéries testées se sont montrées résistantes à cet extrait.

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que l'extrait aqueux et l'hydrolat n'ont aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches bactériennes testées.

Les zones d'inhibition obtenue par l'antibiotique (Oxacilline) sont seulement apparues avec *S. aureus* et *B. cereus*, avec des diamètres d'inhibition respectivement de 28 mm et 14.5 mm (figure 10).

Les résultats obtenus par l'antibiotique (Oxaccilline) avec *B. cereus* sont presque les mêmes obtenus par l'extrait méthanolique, mais avec des concentrations plus grandes. À une concentration de 1µg/ml d'antibiotique, nous avons obtenu une zone d'inhibition de 14,50 mm et presque le même diamètre apparait avec l'extrait méthanolique : 14,75 mm à une concentration de à 2%.

Les souches de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*, se sont révélées résistantes au Métronidazole (figure 10).

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes est due aux différents substances actives présents dans ces extraits. La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes (**Yakhlef, 2011**).

Les résultats obtenus ont mis en valeur un pouvoir antimicrobien intéressant, ce qui explique son utilisation dans la pharmacopée traditionnelle comme plante médicinale à effet anti-infectieux et contre les affections pulmonaires (**khadir et al. 2013**).

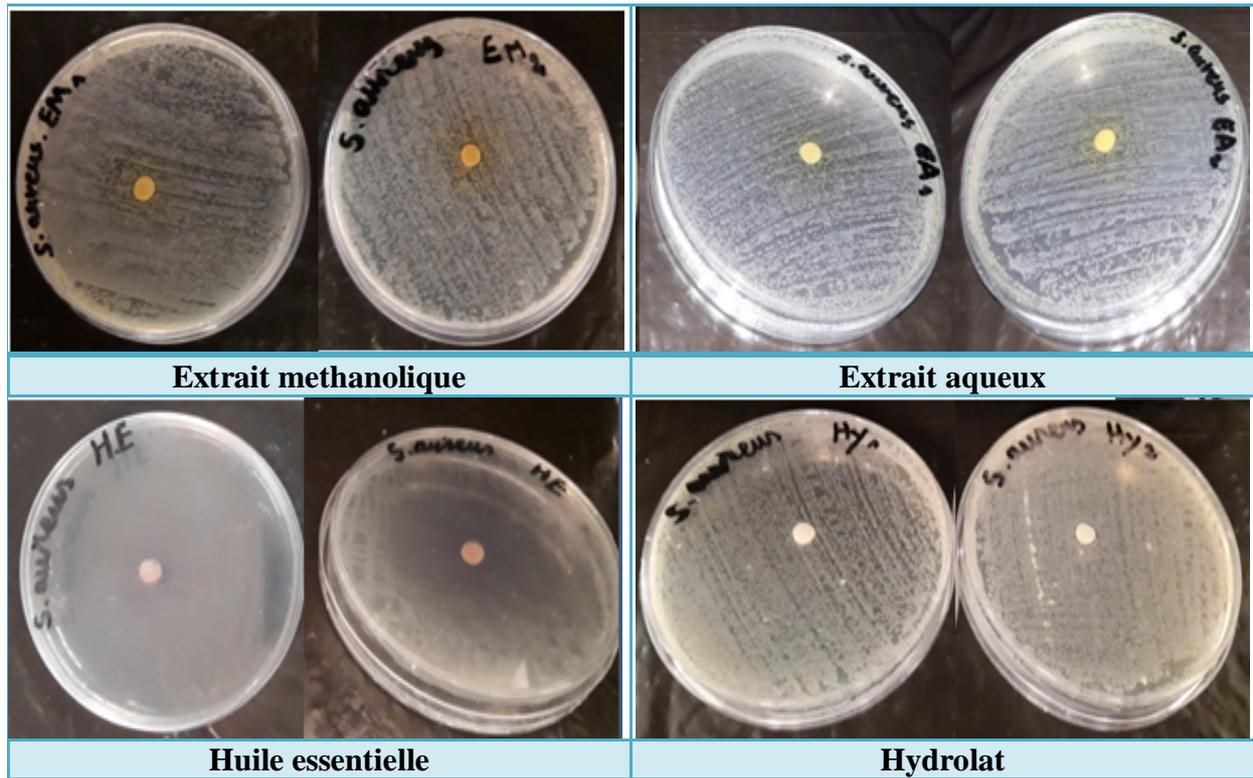


Figure 7 : Test de sensibilité aux extraits de la plante pour *S.aureus*

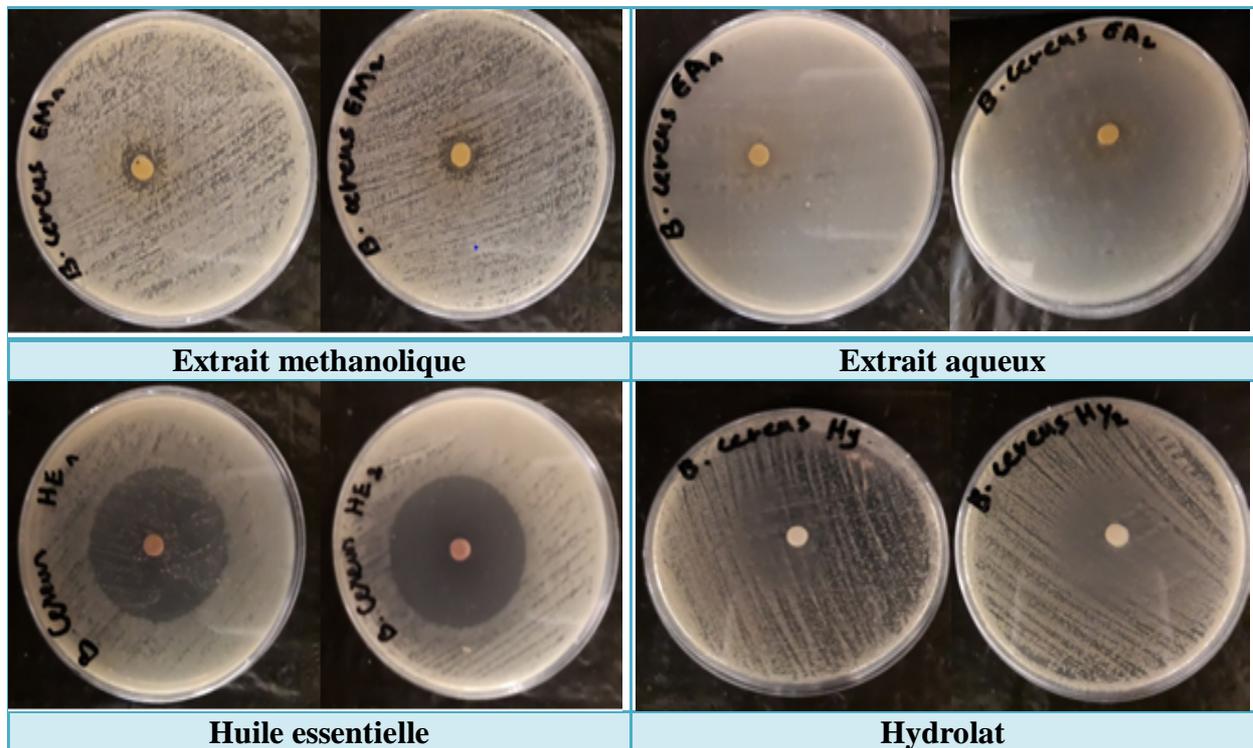


Figure 8 : Test de sensibilité aux extraits de la plante pour *B. cereus*

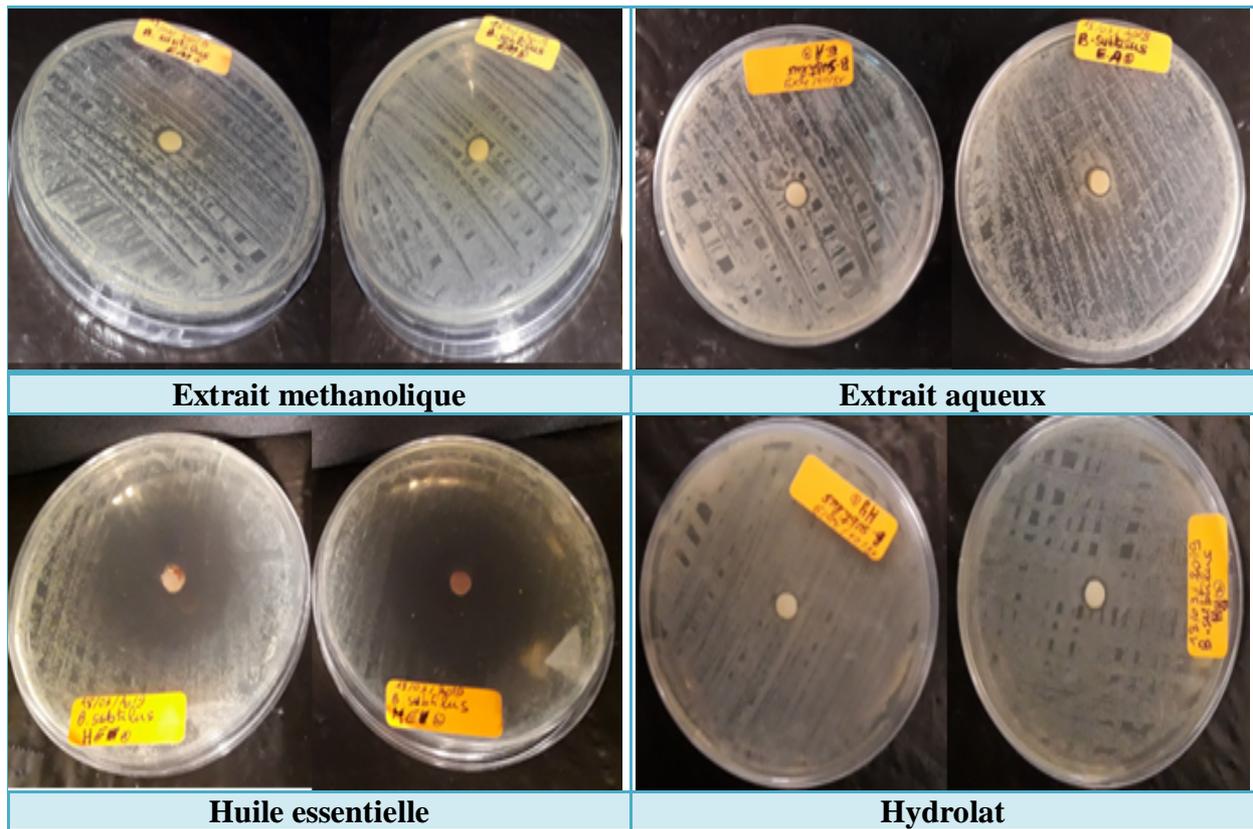


Figure 9 : Test de sensibilité aux extraits de la plante pour *B. subtilis*

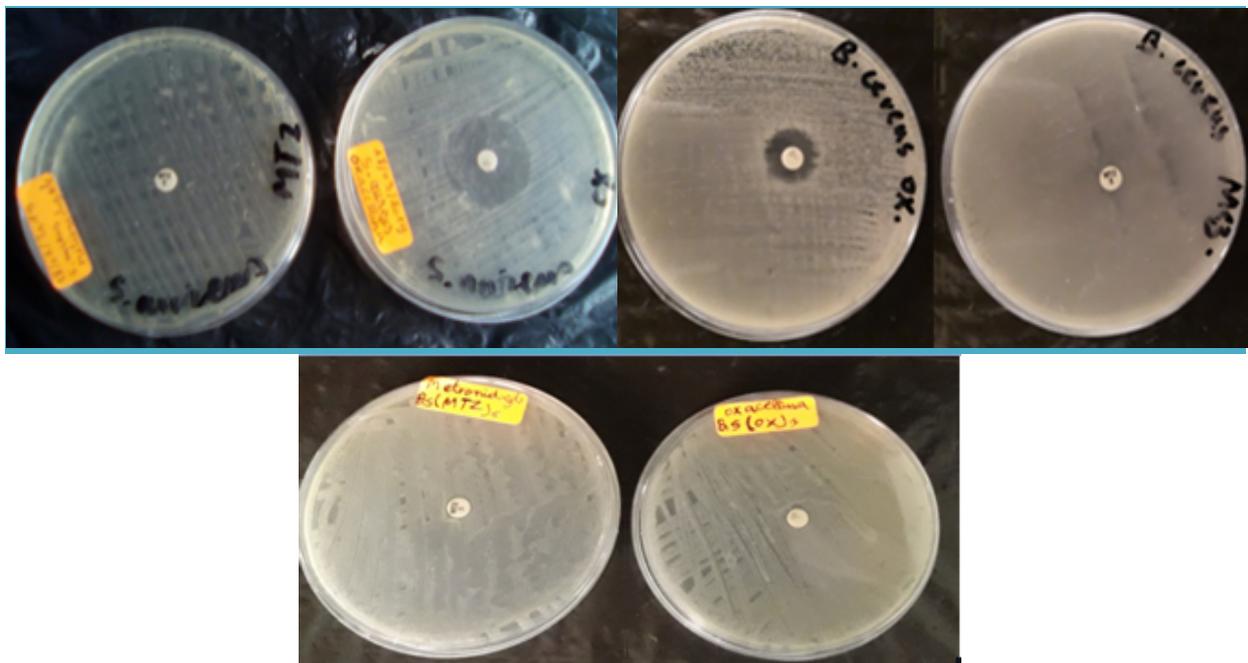


Figure 10: Test de sensibilité aux antibiotiques Métronidazole (MTZ) et Oxacilline (OX) pour les souches bactériennes testées

3.4.3. Étude quantitative de l'activité antibactérienne de l'HE de *Thymus lanceolatus* Desf.

Le tableau ci-dessous résume les résultats de la concentration minimale inhibitrice et de la concentration minimale bactéricide de l'HE de *Thymus lanceolatus* Desf.

Tableau 6 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB)

Souches bactériennes	CMI (%)	CMB (%)	CMB/CMI
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,03	0,5	16,67
<i>Bacillus cereus</i>	0,03	2	66,67
<i>Bacillus subtilis</i>	0,03	2	66,67

La taille de la zone d'inhibition reflète d'une manière directe les valeurs de CMI. Les extraits ayant induit une importante zone d'inhibition présentent les plus petites CMI sur les souches correspondantes. Ce n'est pas le cas pour *Staphylococcus aureus* ou elle a montré une grande zone d'inhibition alors que leur CMI (0,03%) est similaire à celle de *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*.

Khadir et al. 2013, ont démontré l'efficacité de l'HE de *Thymus lanceolatus* Desf. originaire de Tlemcen sur plusieurs souches de Gram (+). Ils ont enregistré des valeurs de CMI de 0,25 % pour *Bacillus cereus* et de l'ordre de 0,0625 % pour *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*. L'huile essentielle testée a montré une meilleure action bactériostatique sur les souches étudiées par rapport à ces derniers (figure11).

Les résultats obtenus montrent que la valeur la plus élevée de CMB a été observée chez *Bacillus cereus* (figure13) et *Bacillus subtilis* (figure14) et qui est de 2%. Par contre la valeur la plus faible, qui est de 0,5% est notée chez *Staphylococcus aureus* (figure12).

Toutes les valeurs de CMB/CMI sont supérieures à 4, donc l'huile essentielle de *Thymus lanceolatus* Desf. a révélé un effet bactériostatiques sur les trois souches testées.

Boulaghmen et al (2018) ont démontré l'efficacité de l'HE de *Thymus guyonii* de Noé, récoltées au niveau des montagnes de Sidi Bouzid Aflou Wilaya de Laghouat, sur plusieurs souches. Ils ont enregistré des valeurs de CMB de 0,125% pour *S. aureus*, 0,06% pour *B. cereus* et de 0,125% pour *B. subtilis*. L'effet de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* de Noé sur les souches bactériennes était supérieur à celui retrouvées dans nos résultats.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles est liée à la présence des phénols (thymol et carvacrol) qui sont majoritaires dans l'huile du Thym (**valero et al. 2006**). Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces (**Zhiri, 2006**) (**Mebarki, 2010**). Cependant, les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de cette activité. La totalité de la composition chimique de l'huile essentielle doit être prise en compte car les composés minoritaires jouent aussi un rôle important en renforçant les effets des composés principaux par synergie (**Burt, 2004**) (**Yekhlef et al. 2011**).

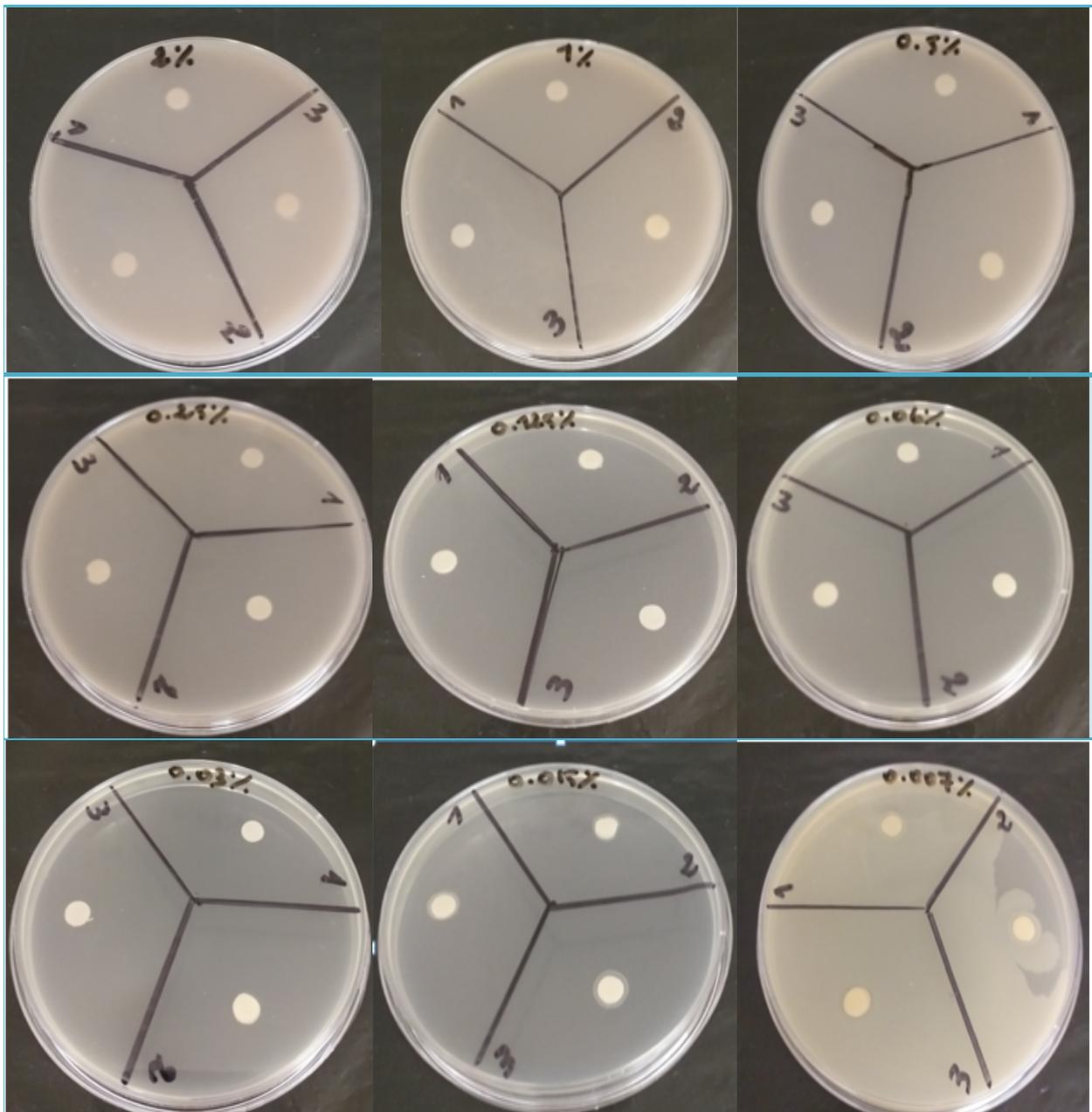


Figure 11: Concentrations minimales inhibitrices pour les souches bactériennes testées

1 : *S. aureus*, 2 : *B. cereus* 3 : *B. subtilis*

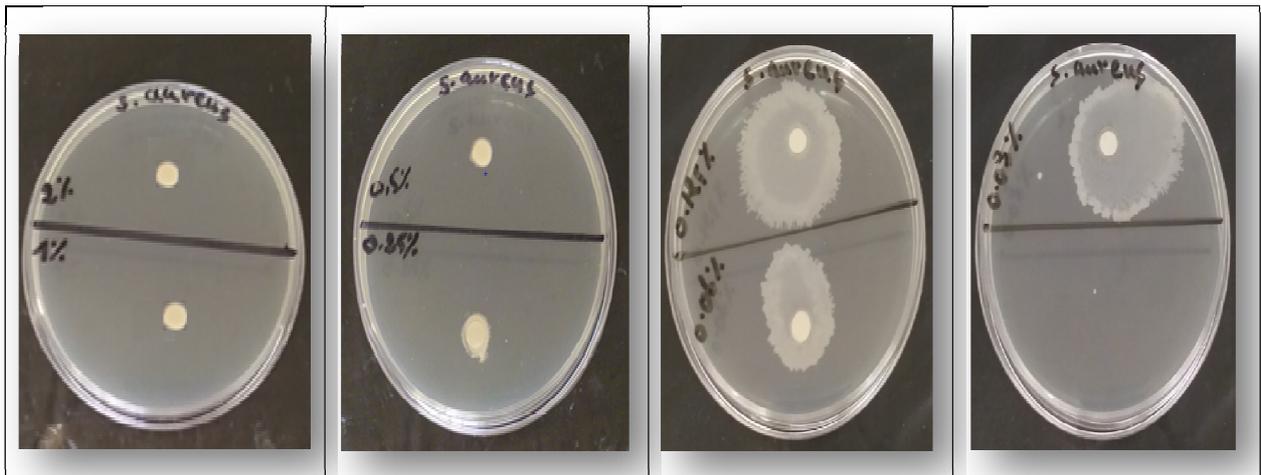


Figure 12: Résultats de concentration minimale bactéricide (CMB) pour *S. aureus*



Figure 13: Résultats de concentration minimale bactéricide (CMB) pour *B. cereus*

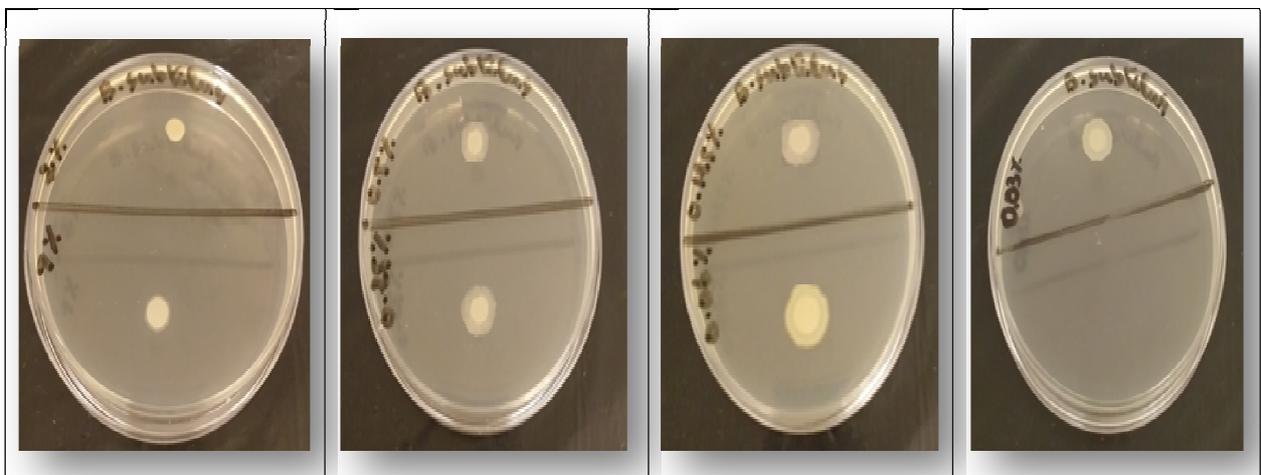


Figure 14: Résultats de concentration minimale bactéricide (CMB) pour *B. subtilis*

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Elles constituent une source importante de molécules antimicrobiennes notamment dans leurs extraits volatiles, et le genre *Thymus* est considéré parmi les plus riches en huiles essentielles.

Le présent travail a porté sur l'étude de l'effet antibactérien des différents extraits (méthanolique, aqueux, hydrolat et huile essentielle) de la partie aérienne de *Thymus lanceolatus* Desf., utilisée dans la pharmacopée traditionnelle de quelques régions d'Algérie.

Les rendements en extrait méthanolique et aqueux obtenus par macération sont respectivement 9% et 19,6%.

L'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation a donné un rendement important de 1,55%. La détermination du rendement en hydrolat a montré une rentabilité égale à 65,3%.

Le criblage phytochimique avec des tests spécifiques a permis de caractériser les polyphénols, les saponines, les flavonoïdes, les tanins catéchiques, les sucres réducteurs, les coumarines, les quinones libres, les anthocyanes et les alcaloïdes. Ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques.

L'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits de *Thymus lanceolatus* Desf. par la méthode de diffusion en milieu solide a révélé que l'HE possède un large spectre d'action vis-à-vis de toutes les bactéries testées. Ce qui rend possible son utilisation thérapeutique comme antibiotique.

Nos résultats préliminaires montrent que tous les extraits bruts testés témoignent d'activités antimicrobiennes *in vitro*. D'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- 1) Partant du fait qu'une substance pouvant être très active *in vitro*, peut perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps, une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue globale sur l'activité antimicrobienne des extraits testés.
- 2) Isolement et caractérisation des composés actifs dans les différents extraits par des méthodes plus spécifiques.

Références bibliographiques

- **Achille. R., 1980.** Botanique médicale, 4ème Ed. Paris, 321.
- **Aljabre. S.H.M, 2005.** In vitro antifungal activity of thymoquinone against *scopulariopsis brevicaulis*. Aromatherapy, 15, 129-133.
- **Amarti. F., Satrani. B., Ghanmi. M., Aafi. A., Farah. A., Aarab.L., El Ajjouri. M., Guedira. A., Chaouch. A, 2011.** Activité antioxydant et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc. Acta Bot. Gallica, 158 (4), 513-523.
- **Bauer. K.D., Garbe. H., Surburg. H, 1997.** Common fragrance and flavor materials. Weinheim. Germany: Wiley-VCH Verlag.
- **Benbelaïd. F., Khadir. A., Abdoune .M., Bendahou. M, 2013.** Phytochemical screening and in vitro antimicrobial activity of *Thymus lanceolatus* Desf. From Algeria. Asian Pac J Trop Dis, 454-459.
- **Bessas. A., Benmoussa. L., Kerarma. M, 2007.** Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire de Master.
- **Bouchouka. E, 2016.** Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydantes et antibactériennes de quelques plantes sahariennes. Thèse de doctorat. Université Annaba.
- **Bougharara. B, 2016.** Inventaire et étude ethnobotanique et chimique des plantes à intérêts thérapeutique et nutritif du Parc national El- kala. Thèse Doctorat. Université Badji Mokhtar – Annaba-, 67p.
- **Boulaghmen. F., Chaouia. C., Hazzit. M., Nouas. M., Saidi. F, 2018.** Composition chimiques et activité antimicrobienne d’huile essentielle extraite de *Thymus guyonii* de Noé d’Aflou –Algerie-, Revue Agrobiologia, (2018) 8(1): 853-862.
- **Buronzo. A., 2008.** Le grand guide des huiles essentielles. France: Hachette livre. 4-25p.

Références Bibliographique

- **Burt. S, 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of food and Microbiology*, 94 : 223-253.
- **Claisse. R, 1993.** Plante à usage dermatologique de la pharmacopée traditionnelle marocaine. *Médicaments et aliments: l'approche ethnopharmacologique*, 24 (27) : 172-173. 71.
- **Cowan. M.M, 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(4), 564- 582.
- **Daira. N., Maazi. M.C., Chefrou. A, 2016.** Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale *Ammoidesverticillata* Desf. Briq. de l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 276 – 290.
- **Dellaras. C, 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation. Lavoisier. Paris.
- **Denis. F., Ploy. M.C., Martin. C., Bingin. E., Quentin. R, 2007.** Bactériologie médicale édition Masson.
- **Diallo. D, 2000.** Ethno pharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinusoppositifolius*, *Diospyrosabyssinica*, *Entadaafricana*, *Trichiliaaetic*. Thèse de doctorat. Université de Lausanne Suisse.
- **Dob. T., Dahmane. D., Benabdelkader. T., Chelghoum. C, 2006.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii*. *Journal of pharmaceutical biology*, 607-612p.
- **Dohou. N, 2004.** Approche floristique, ethnobotanique, phytochimique et étude de l'activité biologique de *thymelaelythroïdes*. Thèse de doctorat. Maroc, 59 p.
- **Donatien. K, 2009.** Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes extraction, identification d'alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols : Etude de leur activité antioxydante. Thèse de doctorat. Université de Bamako, 21p.
- **Edeas. M, 2007.** Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5, 264-270.

Références Bibliographique

- **El Ajjouri. M., Ghanmi. M., Satrani. B., Amarti. F., Rahouti. M., Aafi. A., Ismaili.R., Abdellah Farah. A, 2009.** Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss et Reut et *Thymus ciliatus* Desf. Benth contre les champignons de pourriture du bois. Acta Bot. Gallica, 157(2), 285-294.
- **Elamri. J., Elbadaoui. K., Zair. T., bouharb. H., chakir. S., Alaoui. T.L, 2014.** Étude de l'activité antibactérienne des huiles Essentielles de *Teucriumcapitatum* L et l'extrait de *Silénevulgaris* sur différentes souches testées. 82:7481– 7492.
- **Essawi. T, Srour. M, 2000.** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. J. Ethnopharm, 343-349.
- **Falleh. H., Ksouri. R., Chaieb. K., Karray. B.N., Trabelsi. N., Boulaaba. M., Abdelly. C, 2008.** Phenolic composition of *Cynaracardunculus* L. organs, and their biological activities. Compte Rendu de Biologie, 331, 372-379.
- **Ferhat. M, 2016.** Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques des espèces *Menthaaquatica*, *Stachysguyoniana* et *Thymus dreatensis* Lamiaceae. Thèse Doctorat. Université des Freres Mentoui –Constantine-.
- **Guiraud. J.P, 1998.** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. Paris, 136-144p.
- **Haddouchi. F., Benmansour. A., 2008.** Huiles essentielles, utilisations et activité biologiques, application à deux plantes aromatiques. Les technologies de laboratoire. Article de synthèse, 8: 1-8.
- **Harborne. J.B, 1998.** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. 3 Editions.
- **Heni. S, 2016.** Sélection d'extraits bio-actifs des espèces du genre *Thymus* comme conservateurs antibactériens naturels. Thèse de Doctorat des sciences. Université Badji Mokhtar – Annaba-.

- **Kabouche. Z., Boutaghane. N., Laggoune. S., Kabouche. A., Ait-kaki. Z., Benlabed. K, 2005.** Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *Int. J.*
- **Kambouche. N., Merah. B., Bellahouel. S., Bouayed. J., Dicko. A., Dourdour. A., Younos. C., Soulimani. R, 2008.** Chemical composition and antioxidant potential of *Rutamontana* L. essential oil from Algeria. *Journal of Medicinal Food*, 11(3) : 593-595.
- **Kazmi. M.A., Sakmar. T., Ostrer. H, 1997.** Mutation of a conserved cysteine in the X- linked cone opsins causes color vision deficiencies by disrupting protein folding and stability. *Investigative ophthalmol and visci*, 38: 1074-1081.
- **Khadir. A., Bendahou. M., Benbelaid. F., Abdoune. M., Abdelouahid. D, 2013.** Pouvoir antimicrobien de *Thymus lanceolatus* Desf. récolté en Algérie. *Phytothérapie*, 11: 353-358.
- **Kholkhal. F, 2014.** Etude Phytochimique et Activité Antioxydant des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*. Thèse de Doctorat. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen-.
- **Lee. K.W., Kim. Y.J., Lee. H.J., Lee. C.Y, 2003.** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Tea and Red Wine. *J. Agric. Food Chem*, 51: 7292-7295.
- **Lee. S.J., Umamo. K., Shibamoto. T., Lee K.G, 2005.** Identification of volatile components in basil *Ocimum basilicum* L. and thyme leaves *Thymus vulgaris* and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91 :131-137.
- **Majhenic. L., Kerget. M.S., Knez. Z, 2007.** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 1258–1268.
- **Marchal. L., Bourdon. J.L., Richard. C, 1982.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .Ed. Doin Paris.

Références Bibliographique

- **Martin. S., Andriantsitohaina. R, 2002.** Mécanismes de la protection cardiaque et Vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie*, 51, 304 – 315.
- **Mebarki. N, 2010.** Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanessi* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Thèse de Magistère en Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques option Industrie Pharmaceutique. Université M'hamed Bougara. Université Boumerdes, 185p.
- **Mibindzou. M.A, 2004.** Screening phtochimique de deux espèces de plantes *Crotaliaretusa L* papilionaceae et *Halleaciliata* Aubrev et Pelleger. Rubiaceae récoltées au Gabon. Thèse de doctorat. Mali, 58 p.
- **N'guessan. K., Beugré. K.B., Zirihi. G., Traore. D., ké-assil. L, 2009.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou Agboville, Côte-d'Ivoire. *Sciences et Nature*, 1- 15.
- **Naghibi. F., Mosaddegh. M., Mohammadi.M.S., Ghorbani. A, 2005.**Labiatae Family in folk Medicine in Iran from Ethnobotany to Pharmacology. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 63-79 p.
- **Nikolić. M., Glamočlija. J., Ferreira. I. C., Calhelha. R.C., Fernandes. Â., Marković. T., Soković. M, 2014.** Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor Références bibliographiques 48 activity of *Thymus serpyllum L.*, *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris L.* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.
- **Oussou. K.R, 2008.** Etude chimique et activité antidiarrheique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 24 (1) : 94- 103.
- **Padrini. F., Lucheroni. M.T, 1996.** Le grand livre des huiles essentielles. Ed. Phlorotannin-protein interactions. *Journal of chemical ecology*, 22 P 1887-1899.
- **Pariente. L, 2001.** Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2 ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris 1643 p.

- **Paul. I., 2001.** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Hong Kong.10-14p.
- **Ponce. A.G., Fitz. R., Del valle. C., Roura. S.I, 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Libensmittel wissenschaftund technology*, 500-508 p.
- **Prescott. LM., Harley. J.P., Klein.D.A, 2003.** Les bactéries lactiques les Gram positif pauvres en GC. *Microbiologie*, 2eme Ed française. Université, Bruxelles, Belgique, 5A-535.
- **Quezel. P., Santa S, 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques. Tome II, Ed. CNRS .Paris, 600p.
- **Quezel. P., Santa. S, 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS. Paris, 636 -804p.
- **Randrianarivelo. R., Sarter. S., Odoux. E., Brat. P., Lebrun. M., Romestand. B., Menut. C., Andrianoelisoa. H.S., Raherimandimby. M., Danthu. P, 2009.** Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosmafragrans*. *Food Chemistry*, 114: 680-684.
- **Rasooli. I., Rezaei. M. B., Allameh. A, 2006.** Ultrastructural studies onantimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International journal of infectious diseases*, 10 (3), 236-241.
- **Roques. C., Billerbeck. V.G., Bacaria. J, 2003.** Détermination des CMI et QMI des produits air pharma sur des souches bactériennes multi résistantes. *Sci. Aliments*, 13 : 1-8.
- **Rota. M.C., Herrera. A., Martinez. R.M., Sotomayor. J.A., Jordàn. M.J, 2008.** Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19: 681-687.
- **Sidali. L., Brada. M., Faucunier. M., Logny. G, 2014.** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* du Nord d'Algérie. *PhytoChem et BioSub Journal*, 56-163.

- **Valero, M., Franés. F, 2006.** Synergistic bacteriosidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde orthymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* carrot broth – Food Microbiology, 23: 68-73.
- **Vincken. J.P., Heng. L., Groot. A., Gruppen. H, 2007.** Saponins classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry, 68: 275-297.
- **Yakhlef. G.,Laroui. I., Hambaba. L., Aberkane. M.C., Ayachi. A, 2011.** Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurusnobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle, 209-218.
- **Yves. A., Janat. A., Boua. B., Fézan. H., Ehouan. E, 2007.** Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* Baill. *Herend* et *Zarucchi* Caesalpiniaceae. Sciences et Nature, 217-225.
- **Zarai. Z., Kadri. A., Ben Chobba. I., Ben Mansour. R., Bekir. A., Mejdoub. A., Gharsallah. N, 2011.** The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. Lipids in Health and Disease, Vol.10, 161p.
- **Zhiri. A, 2006.** Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News Science et Nutrition. Prévention et santé. Edité par la fondation pour le libres choix, 12 :8.

Résumé

Résumé

Notre travail porte sur l'étude de l'effet antibactérien et la caractérisation phytochimique des parties aériennes de *Thymus lanceolatus* Desf. appartenant de la famille des Lamiaceae. Communément appelée Zaater. L'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles a fourni des rendements rentables à l'échelle industrielle (1,55 %). Le rendement en hydrolat est de 65,3%.

Les rendements en extrait méthanolique et aqueux obtenus par macération sont respectivement 9% et 19,6%. Le screening phytochimique de la plante nous a révélé la présence de plusieurs groupes chimiques : des polyphénols, des saponosides, des flavonoïdes, des tanins catéchiques, des sucres réducteurs, des coumarines, des quinones libres, des anthocyanes et des alcaloïdes. L'évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Thymus lanceolatus* Desf. vis-à-vis les trois souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*) a montré que l'huile essentielle exerce une activité considérable contre les bactéries testées.

Mots clés: *Thymus lanceolatus* Desf., huile essentielle, hydrolat, extrait méthanolique, extrait aqueux, activité antibactérienne, screening pytochimique.

ملخص

يتمحور عملنا حول دراسة النشاط المضاد للبكتيريا والفحص الكيميائي للجزء العلوي لنبات *Thymus lanceolatus* Desf. الذي ينتمي إلى عائلة Lamiaceae والمسمى عامة بالزعرتر. إن استخلاص الزيت الأساسي لنبات *Thymus lanceolatus* Desf. بواسطة التقطير المائي أعطى مردودا قيما قدر ب 1,55%. أما بالنسبة مردود الماء العطري فقد قدر ب 65,3%. إن مردود المستخلصات الميثانولية والمائية المتحصل عليها بطريقة التنقيح هو على التوالي: 9% و 19,6%.

كشفت لنا الفحص الكيميائي النباتي عن وجود عدة مواد كيميائية البوليفينول، الصابونين، الفلافونويد، العفص، السكريات المرجعة، الكوماغين، الكينونات الحرة، أونتوسيان، قلويدات.

أظهرت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات نبات *Thymus lanceolatus* Desf. ضد ثلاث سلالات بكتيرية (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) أن الزيت الأساسي يمتلك نشاط معتبر ضد البكتيريا المختبرة.

الكلمات المفتاحية: *Thymus lanceolatus* Desf.، الزيت الأساسي، الماء العطري، المستخلص الميثانول، المستخلص المائي، النشاط المضاد البكتيريا، الفحص الكيميائي النباتي.

Abstract

Our work is based on the study of the antibacterial effect and the characterization of some active secondary metabolites of the aerial part of *Thymus lanceolatus* Desf. belonging to the family Lamiaceae, commonly known as Zaater. The extraction of the essential oil was accomplished by hydrodistillation. The essential oil has a high yield of the order of 1.55 %. The hydrosol give a high yield of 65,3%.

The determination of the yields of crude extracts obtained from maceration showed a significant profitability in methanolic and aqueous extracts in the plant with values of 9% and 19.6 % respectively. The phytochemical screening revealed the presence of polyphenols, saponosides, flavonoïds, tannins catéchic, reducing sugars, coumarin, free quinones, anthocyanins and alkaloids. The antimicrobial activity has shown that the essential oil has a considerable antimicrobial spectrum against all bacteria tested.

Key words: *Thymus lanceolatus* Desf., essential oil, hydrosol, extract methanolic, extract aqueous, antibacterial activity, phytochemical screening.

Annexes

Annexe A

Tableau A1 : Appareillages, produits et verreries

Appareillages	Verreries	Produits
-Balance analytique	Verre de montre	-Eau distillée
-Agitateur magnétique	-Béchers	-Eau physiologique
-Rotavapeur	-Ballons	-Méthanol
-Montage d'hydrodistillation	-Éprouvettes	-solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%.
-Bain marie	-Erlenmeyers	-Acétate de sodium
-Étuve	-Barreaux magnétiques	-Na OH (10%)
-Autoclave	-Tubes à essais	-Anhydride acétique
-Spectrophotomètre	-Fioles jaugées	-Acide sulfurique (H ₂ SO ₄) concentré.
-Microscope optique	-Pipettes graduée	-Chlorure de fer (III) FeCl ₃
-Réfrigérateur	-Pipettes pasteur	-Stiasny (formole à 40%et d'acide chlorhydrique)
-Incubateur	-L'anse de platine	-Hydroxyde d'ammonium (NH ₄ OH)
- Stérilisateur	-Micropipette	-Éther de pétrole
-Lampe à décantation	-Boites pétri	-Réactif liqueur de Fehling
	-Flacons	-Chloroforme
	- Écouvillon	-HCL 1%
		-Éthanol à 60%
		-Réactif de Dragendorff (1g de nitrate de bisrnuth ,10ml d'acide acétique glacial ,8g d'iodure de Potassium ,20 ml d'acide acétique)
		-Burchard (acide sulfurique concentré, acide acétique anhydre).
		- Gélose nutritive
		-Mueller Hinton

Annexe B

			
Balance analytique	Agitateur magnétique	Rotavapeur	Montage d'hydrodistillation
			
Bain marie	Étuve	Autoclave	Spectrophotomètre
			
Microscope optique	Réfrigérateur	Incubateur	Stérilisateur
			
Lampe à décantation	Bec bunsun	vortex	

Figure B1 : Appareillages utilisés

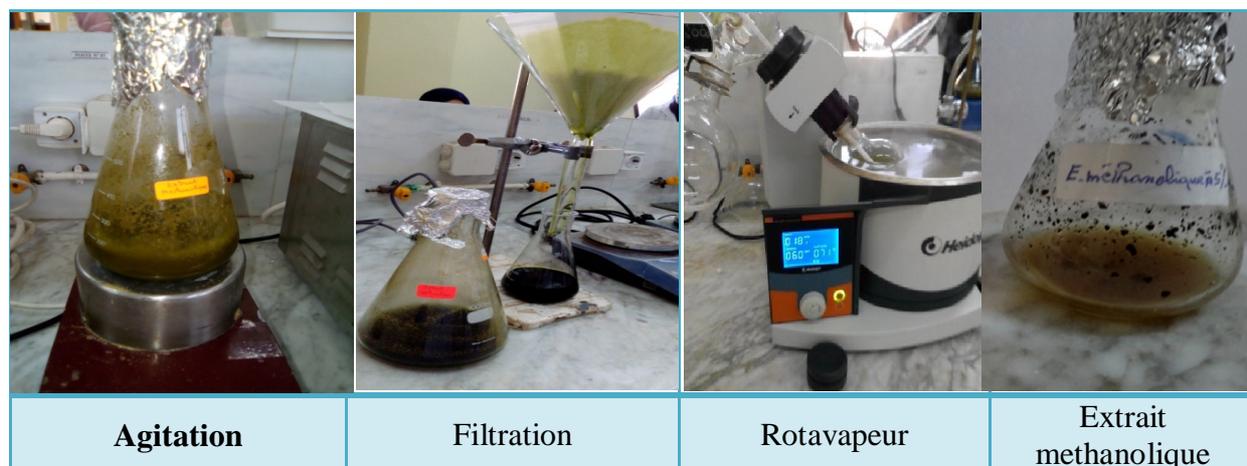


Figure B2 : Préparation d'extrait méthanolique

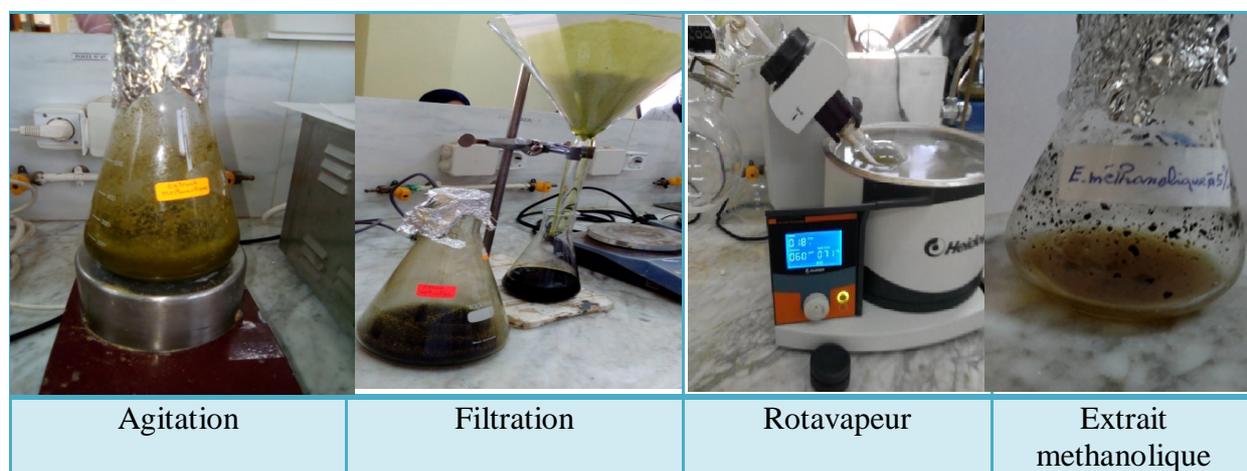
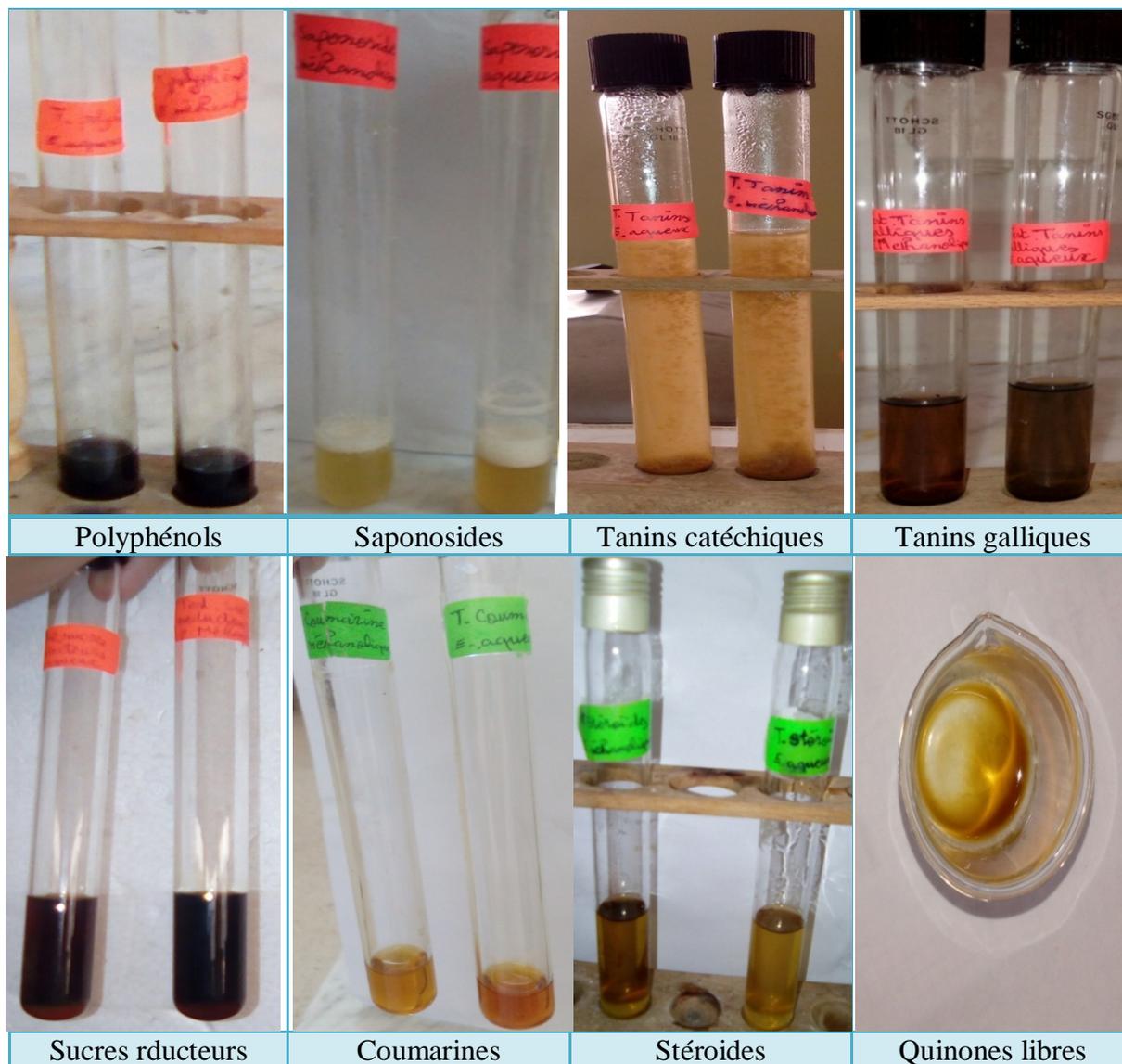


Figure B3: Préparation d'extrait aqueux



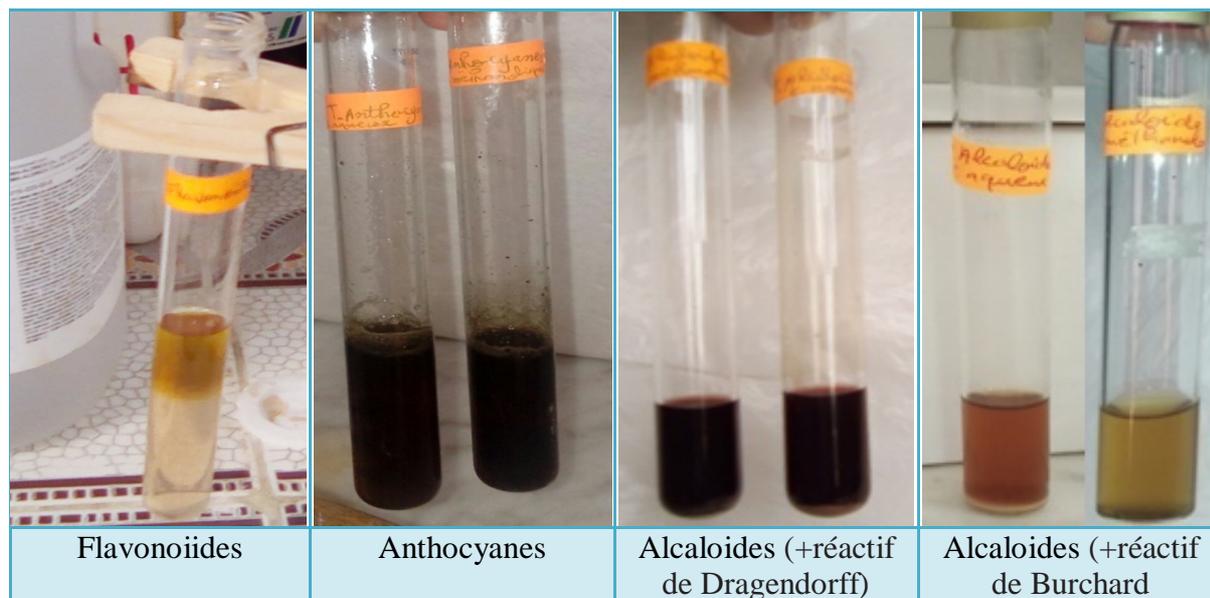


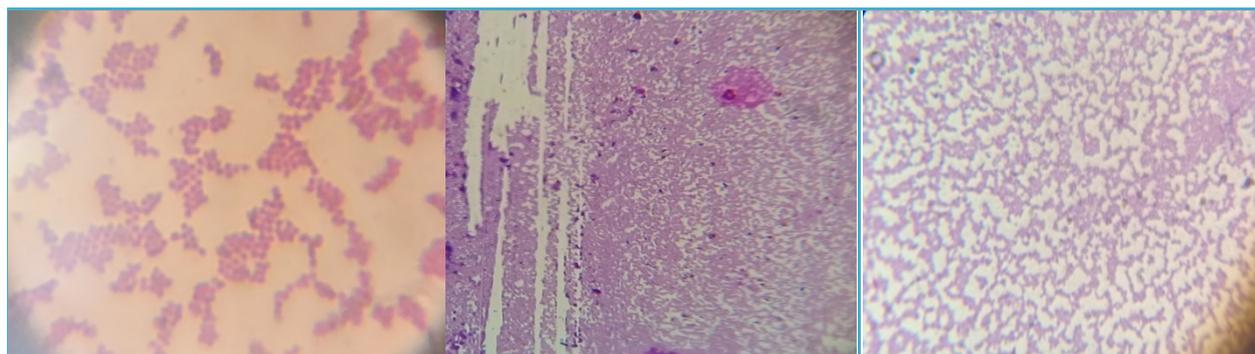
Figure B4: Résultats screening phytochimique de *Thymus lanceolatus* Desf.

Annexe C

➤ Etude de l'effet antibactérien



Figure C1: Revivification des souches bactériennes



<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
------------------------------	------------------------	--------------------------

Figure C2: Aspect microscopique des souches bactériennes

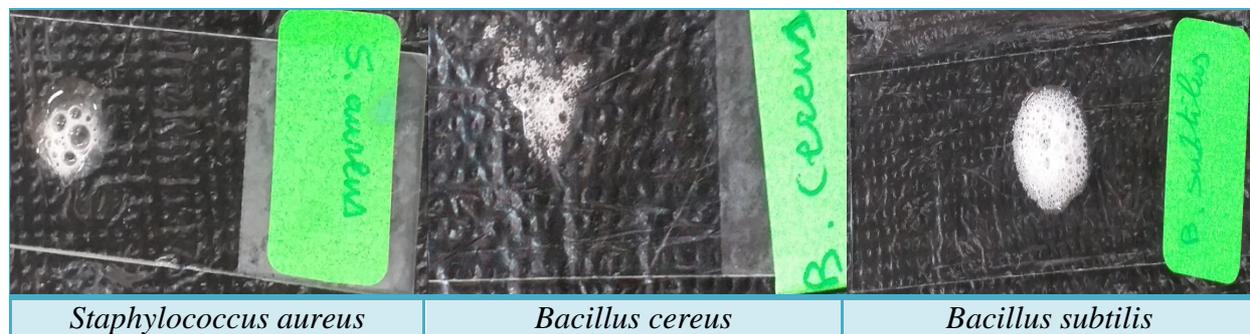
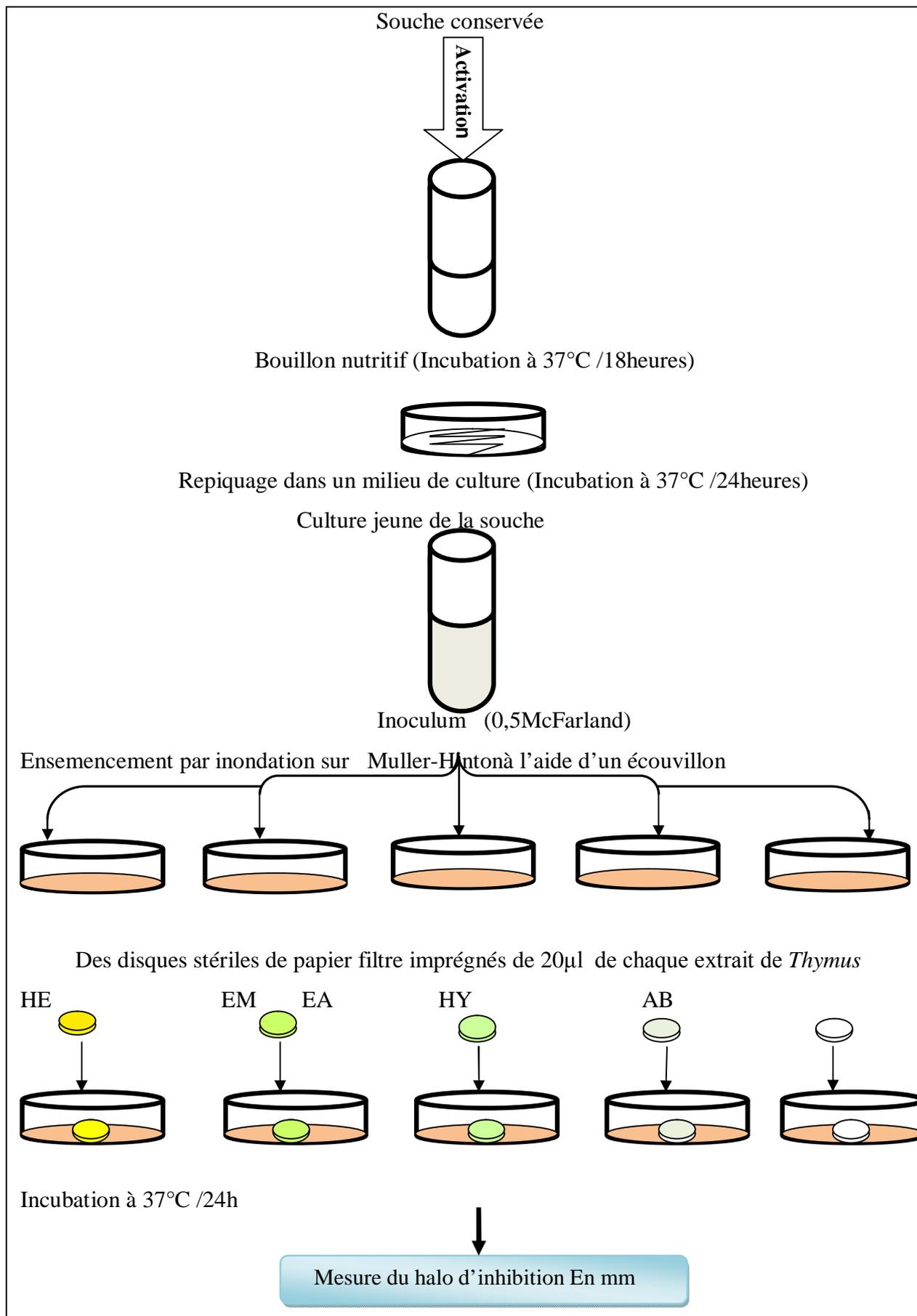


Figure C3 : Test biochimique (Catalase)

**Figure C 4:** Méthode des disques par diffusion sur gélose

Annexe D

➤ Étude statistique de l'activité antibactérienne des extraits de *Thymus lanceolatus* Desf.

Tableau D1 : Statistiques descriptives de l'activité antibactérienne des extraits

Extraits	Souches	Moyenne	Ecart-type	N
HE	Sa	68,2500	1,35000	4
	Bc	44,5000	,57735	4
	Bs	51,5000	5,06623	4
	Total	54,7500	12,84966	12
HY	Sa	3,7500	4,34933	4
	Bc	6,7500	,50000	4
	Bs	8,1250	,25000	4
	Total	6,2083	2,98068	12
EM	Sa	7,2500	,50000	4
	Bc	14,7500	1,25831	4
	Bs	8,8750	,85391	4
	Total	10,2917	3,46711	12
EA	Sa	7,7500	,50000	4
	Bc	7,2500	,50000	4
	Bs	8,8750	,25000	4
	Total	7,9583	,81068	12
MTZ	Sa	6,0000	,00000	4
	Bc	6,0000	,00000	4
	Bs	7,0000	,00000	4
	Total	2,3333	3,44656	12
OX	Sa	28,0000	1,15470	4
	Bc	14,5000	,57735	4
	Bs	7,2500	,28868	4
	Total	16,5833	9,00715	12
Total	Sa	19,1667	24,73102	24
	Bc	14,6250	14,59545	24
	Bs	15,2708	16,67136	24
	Total	16,3542	19,00675	72

Tableau D 2 : Analyse de la variance (Test ANOVA 2 facteurs)

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Extraits	22572,698	5	4514,540	349,732	,000
Souches	289,771	2	144,885	11,224	,000
Extraits * Souches	2089,688	10	208,969	16,188	,000
Erreur	697,063	54	12,909		
Total corrigé	25649,219	71			

Tableau D 3 : Test de Student -Newman-Keuls

A) Facteur *Souches Bactériennes *

Diamètres				
	Souches	N	Sous-ensemble	
			1	2
Student-Newman-Keuls ^{a,b}	Bc	24	14,6250	
	Bs	24	15,2708	
	Sa	24		19,1667

B) Facteur *Extraits*

Diamètres							
	Extraits	N	Sous-ensemble				
	s		1	2	3	4	5
Student-Newman-Keuls ^{a,b}	MTZ	12	2,3333				
	HY	12		6,2083			
	EA	12		7,9583	7,9583		
	EM	12			10,2917		
	OX	12				16,5833	
	HE	12					54,7500
	Sig.			1,000	,238	,117	1,000

