

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad dahleb Blida



Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de biotechnologie

Mémoire de fin en vue de l'obtention d'un Diplôme de Master 2

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème

Étude comparative de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus sp* et *Origanum sp* et l'effet de leurs associations a un antibiotique et un antifongique

Présenté par :

Mme Lounici Wafa et Mlle BenkiarAsma

Soutenu le : **12 septembre 2019**

Devant le jury composé de :

Mme Benchabane D.	MAA	USDB1	Présidente
Mme Benoussaid N.	MCB	USDB1	Promotrice
Mm Benkorteby H.	MAB	USDB1	Examinatrice

Promotion 2019

Remerciements

Tous d'abord, nous voulons dire que grâce à ALLAH que nous sommes arrivés à réaliser ce travail, qui est un résultat d'une longue durée d'investigation, d'analyses et d'élaboration malgré toutes les difficultés que nous avons eu,Merci. ALLAH

Nous remercions notre promotrice Madame Benoussaid, pour sa patience, et surtout pour sa confiance, ses remarques et ses conseils, sa disponibilité et sa bienveillance.

Nous voudrions également remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail et pour toutes leurs remarques et critiques.

Nous remercions Madame CHADER chef de service de stérilité à l'unité SAIDAL de Gué de Constantine, ainsi Madame LARDJANE pour sa grande disponibilité, son aide et sa gentillesse, ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire de microbiologie.

Ainsi que tout le personnel et les enseignants du département pour leur soutien inestimable. A tous nos enseignants qui nous ont initiés aux valeurs authentiques, en signe d'un profond respect et d'un profond amour

!!!

Merci à vous tous

Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que : Je dédie ce mémoire de master à

Mes très chers parents qui m'ont aidé, soutenu et Encouragé

Dans toutes les épreuves de ma vie, qu'ils trouvent

Ici tous signe de ma gratitude pour leurs sacrifices ;

A Mon très cher mari Abdelwahab

A Ma chère sœur Yasmine

A mon binôme et A tous mes amies sans exception

A tous les gens de ma promotion enseignants

Et étudiants

wafa

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ceux qui me sont chers,

A mes parents,

Aucune dédicace ne serait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous ne cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuit pour mon éducation et mon bien être, toute cette abnégation dont vous avez fait preuve afin que je devienne ce que je suis, je vous en serai éternellement reconnaissante. Que Dieu, tout puissant, vous préserve et vous accorde la bonne santé, longue vie et bonheur.

A mes chères adorables et uniques sœurs Imene, et Sara.

A mon chère adorable et unique frère yacine.

A toute ma grande famille.

A tous mes amis (Ramila, Lyna et Riadh) qui ont su de loin m'encourager et me soutenir

A toute la promotion master II Biotechnologie microbienne 2019.

ASMA

Liste des figures

Figure 1 : Aspect morphologique de <i>Thymus fontanessii</i>	3
Figure 2 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne.....	13
Figure 3 : Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri.....	14
Figure 4 : Illustration de la méthode des micro-atmosphères.....	15
Figure 5 : Dispositif de l'hydrodistillation de type clewenger.....	23
Figure 6 : Les suspensions microbiennes dans l'eau physiologique stérile.....	25
Figure 7 : Ensemencement des germes par écouvillonnage.....	26
Figure 8 : Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles (<i>Thymus fontanessii</i> et <i>Origanum floribundum</i>).....	33
Figure 9 : Zones d'inhibition de l'huile essentielle du thym (<i>Thymus fontanessii</i> Boiss et Reut) vis-à-vis des souches.....	34
Figure 10 : Zones d'inhibition de l'huile essentielle de l'origan (<i>Origanum floribundum</i>) vis-à-vis des souches.....	35
Figure 11 : Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques	35
Figure 12 : Effet des antibiotiques vis-à-vis les souches.....	36
Figure 13 : Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle de <i>T. fontanessii</i> , des antibiotiques et de leur association.....	37
Figure 14 : Synergie de l'H.E du thym et les l'antibiotiques.....	38
Figure 15 : Diamètres des zones d'inhibition de de l'H.E de <i>Origanum floribundum</i> , de l'association HE origan/atb et des l'antibiotiques.....	39
Figure 16 : Synergie de l'H.E de l'origan et les antibiotiques.....	40

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	11
Tableau 2 : identité des espèces étudiées (<i>Thymus fontanesii</i> et <i>Origanum floribundum</i>).....	21
Tableau 3 : Identification des souches microbiennes utilisées.....	21
Tableau 4 : échelle de l'activité antimicrobienne en fonction de diamètre de la zone d'inhibition.....	27
Tableau 5 : Diamètre des zones d'inhibitions des antibiotiques.....	28
Tableau 6 : Rendements d'extraction des H.Es.....	32
Tableau 7 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'H.E thymus fontanesii.....	41

Liste des abréviations

- **HE** : huile essentiel
- **HEs** : huiles essentielles
- **DL 50** : Dose létale 50%
- **CRD** : Centre de recherche et développement
- **Ec** : *Escherichiacoli*
- **ml** : millilitre
- **mm** : millimètre
- **mg** : milligramme
- **mn** : Minute
- **µl** : microlitre
- **p** : Beta
- ° : Degré
- °C : Degré Celsius
- ± : Plus ou moins
- **g** : Gramme
- **ZI** : zone d'inhibition
- **MH** : mullerhinton
- **ATB** : antibiotique
- **h** : heure
- **CMI** : concentration minimal inhibitrice
- **CFU** : unités formant colonies
- **PBS** : phosphate buffered saline
- **SAB** : sabouraud
- **T** : temperature
- **UV** : ultra violet
- **EUCAST** : Européen comité on Antimicrobial Susceptibility Testing
- **CPG** : chromatographie en phase gazeuse
- **SM** : spectrométrie de masse
- **RMN** : résonance magnétique nucléaire

Résumé

Notre étude a pour objectif de déterminer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites par hydrodistillation de type Clevenger de deux plantes médicinales (*Thymus fontanesii* et *Origanum floribundum*), dont le rendement obtenu est de l'ordre de 2% et 4.3% respectivement. Cette activité a été mise en évidence par la méthode de l'aromatogramme vis-à-vis de cinq souches (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*), ainsi que les associations huiles essentielles /antibiotiques. Les résultats des activités antimicrobiennes ont montré que l'origan est plus actif sur les bactéries et les champignons avec des diamètres des zones d'inhibitions qui varient entre 21 et 55 mm alors que le thym a montré une activité antibactérienne et anti fongique moins importante que celle de l'origan . Cependant la synergie thym/ ATB (entre 39mm et 50 mm) est plus efficace que la synergie origan / ATB (entre 34 et 49 mm). La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices a été effectuée par la méthode de microdilution en milieu solide, les résultats obtenus montrent que les huiles essentielles donnent des effets antibactériens à de faibles concentrations [25%]. Les résultats du test antimicrobien ont montré que l'huile essentielle de *Origanum floribundum* a la plus forte inhibition vis-à-vis les microorganismes testés.

Mots clés : huile essentiel, activité antimicrobienne, hydrodistiltation, *thymus fontanesii*, *Origanum floribundum*, Aromatogramme.

Abstract

The objective of our study is to determine the antimicrobial activity of essential oils extracted by Clevenger hydrodistillation from two medicinal plants (*Thymus fontanesii* and *Origanum floribundum*), whose yield obtained is around 2% and 4.3% respectively. This activity has been demonstrated by the aromatogram method with regard to five strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*), as well as essential oil/antibiotic combinations. The results of antimicrobial activities showed that oregano is more active on bacteria and fungi with inhibition zone diameters ranging from 21 to 55 mm while thyme showed less antibacterial and anti-fungal activity than oregano. However, the thyme/ATB synergy (between 39mm and 50mm) is more effective than the oregano/ATB synergy (between 34 and 49mm). The determination of the Minimum Inhibitory Concentrations was carried out by the microdilution method in solid medium, the results obtained show that essential oils give antibacterial effects at low concentrations [25%]. The results of the antimicrobial test showed that the essential oil of *Origanum floribundum* has the highest inhibition against the tested microorganisms.

Keywords: essential oil, antimicrobial activity, hydrodistillation, *thymus fontanesii*, *Origanum floribundum*, Aromatogram.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد نشاط مضادات الميكروبات من الزيوت الأساسية المستخرجة من ، والتي تسفر عن *Origanum floribundum* و *fontanesii* من اثنتين من النباتات الطبية (الغدة الصعترية Clevenger hydrodistillation *Escherichia coli*, الأسلوب ضد خمسة سلالات aromatoqram حوالي 2% و 4.3% على التوالي. هذا النشاط يتضح من ومن الضروري النفط /مجموعات (*staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) المضادات الحيوية. نتائج الميكروبات الأنشطة أظهرت أن الزعتر كان أكثر نشاطا على البكتيريا و الفطريات مع المثبطة منطقة بأقطار تتراوح ما بين (atb /بين 21 إلى 55 ملم ، بينما الزعتر أظهرت أقل مضاد للجراثيم ومضاد للفطريات النشاط من الزعتر . ومع ذلك ، فإن التأزر بين الزعتر بين 34 و49 مم). تحديد الحد الأدنى المثبط تركيزات نفدت من خلال طريقة) atb / 39 مم و50 مم) أكثر فعالية من التأزر بين الأوريغانو في المتوسطة الصلبة ، فإن النتائج التي تم الحصول عليها تبين أن الزيوت الأساسية تعطي تأثيرات مضادة للجراثيم في تركيزات microdilution منخفضة (25%). وأظهرت نتائج اختبار مضادات الميكروبات أن النفط الأساسي من فلوريبيوندوم الأوريغانوم كان مثبطا للغاية للكائنات المجهرية التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: الزيت العطري ، النشاط المضاد للميكروبات ، التكسير المائي

Aromatogramme, thymus fontanesii, Origanum floribundum

Introduction

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Les plantes médicinales et aromatiques	2
1. Les plantes aromatiques	2
2. Les plantes médicinales	2
II. Description botanique et propriétés des plantes étudiées	2
1. le thym	2
1.1 Répartition géographique	2
1.2 Description botanique	3
1.3 Classification.....	3
1.4 Huile essentielle du thym	4
1.5 Propriétés thérapeutique et culinaire.....	4
a) Propriétés thérapeutique	4
b) propriétés culinaire.....	5
2. L'origan	5
2.1 Répartition géographique	5
2.2 Description botanique	5
2.3 Classification	6
2.4 Huile essentielle de l'origan	6
2.5 Propriétés thérapeutique et culinaire	6
a) Propriétés thérapeutique	6
b) propriétés culinaire	6
III. Les huiles essentielles.....	7
1. Généralité	7
2. Localisation des parties sécrétrices des huiles essentiels	7
3. Composition chimique	8
4. Fonction biologique	8
5. Toxicité	9
5.1 Toxicité par ingestion	9
5.2 Toxicité dermique	9
5.3 Toxicité selon la composition	10
6. Utilisation des huiles essentielles	10
6.1 en industrie agro-alimentaire	10
7. techniques d'extraction	11
IV. Activité antimicrobienne	12
1. Historique	12
2. Activité antibactérienne et mécanismes d'actions des huiles essentielles	12
3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HES	13
3.1 principales méthodes	14
a) technique par contact direct	14
b) micro atmosphère	15
3.2 propriétés antibactérienne	15
3.3 propriétés antifongique	15
V. les antibiotiques	16
1. Définition	16
2. Mécanismes d'actions	16
3. Classification	16

4. Spectre d'action	16
5. Type d'action	16
6. Mode d'action	17
7. Origine	17
8. Composition chimique	17
9. Résistance aux antibiotiques	17
9.1 définition	18
9.2 résistance naturelle	18
9.3 résistance acquise	18
9.4 mécanisme génétique de la résistance	18
a) résistance chromosomique	18
b) résistance extra chromosomique	18

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel.....	21
1 Matériel végétal	21
2 Matériel biologique	21
3 Matériel non biologique	22
4 Les antibiotiques.....	22
II. - Méthodes.....	22
II.1 extraction des HES.....	22
II.2 Rendement d'extraction.....	23
III. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HES.....	24
IV. Test d'antibiogramme	27
V. Etude de l'association (HES /ATB) par la méthode des disques.....	28
VI. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne.....	29

Chapitre 3 : Résultats et discussion

I. Résultats et interprétation.....	32
I.1 détermination des rendements	32
I.2 activité anti microbienne des HES	33
I.3 résultats du test d'antibiogramme	35
I.4 étude de l'association de HE de Thymus/ ATB.....	37
I.5 étude de l'association de HE d'origan / ATB.....	39
I.6 évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne	41
II. Discussion	43

Conclusion

Introduction

Introduction

Dans notre société moderne, la médecine courante, d'orientation allopathique, se trouve confrontée à des problèmes majeurs. L'inefficacité des antibiotiques face à certains germes pathogènes devenus résistants, le manque de substances antivirales, l'augmentation des déficiences immunitaires des individus, le cercle vicieux auquel aboutit la prescription continue de médicaments psychotropes (**Richard, 1992**), l'aromathérapie propose des solutions alternatives à ces problèmes. Alors que les microbes deviennent de plus en plus résistants aux structures moléculaires de synthèse des antibiotiques, ils se heurtent plus difficilement à l'infinie diversité et à la complexité des huiles essentielles (**Richard, 1992**). Elles apportent à l'organisme, les concentrés de la nature les plus précieux pour rétablir ou conserver l'équilibre indispensable à la santé (**Mazari et al., 2010**).

Les plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structures chimiques et ils possèdent un très large éventail d'activité biologique. Cependant, l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

Le développement des techniques d'analyse chimique a permis de révéler qu'une espèce végétale peut synthétiser des milliers de constituants chimiques différents, ceux-ci appartiennent à deux types de métabolismes : primaire et secondaire. Le métabolisme secondaire, modelé par le temps et l'évolution, caractérise le profil chimique original de chaque espèce végétale, conduisant à une grande biodiversité moléculaire (**Wichtel et al., 1999**). Dans le réservoir chimique des plantes, les huiles essentielles représentent des molécules de fortes valeurs, utilisées dans la pharmacologie car elles ont un effet spécifique sur d'autres organismes (**Remmal et al., 1993**). Ces plantes possèdent des propriétés biologiques très intéressantes qui se trouvent appliqués dans des divers domaines tel que la pharmacie, la médecine, le cosmétique et l'industrie agro-alimentaire etc...

Les huiles essentielles ont un spectre d'activité très large due à leur nature, pour cela, les activités antibactériennes de ces produits ont été rapportées dans de très nombreux travaux (**Bouzouita et al., 2008**). L'activité antimicrobienne dont dispose la plupart des huiles essentielle est attribuable à la présence d'un certain nombre de composés (**Gilles et al., 2010**). Ainsi, les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêts comme source potentielle de molécules naturelles bioactives.

La famille des plantes Thym et Origan (Lamiacées) est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien et antioxydant (**Bouhdib et al., 2003**).

Introduction

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales, au regard des superficies et des diversités bioclimatique. Les genres *Thymus* et *Origanum* comprennent plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et mêmes dans les régions internes jusqu'aux zones arides. La majorité des espèces recensées en Algérie sont endémiques. Ces espèces sont très riches en huiles essentielles et sont utilisées en médecine populaire pour leurs propriétés antiseptiques, antidiarrhéiques et antibronchiques (**Bruneton, 1993**).

En effet, le présent travail a pour but l'extraction, la caractérisation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des deux plantes précédemment citées.

Notre travail consiste à faire une analyse bibliographique qui a pour objet de donner des informations sur la plante étudiée, présenter les huiles essentielles d'une façon générale, mettre en avant les activités biologiques de ces essences. Les méthodes utilisées pour l'extraction des huiles essentielles des deux plantes étudiées par hydrodistillation, l'évaluation de l'activité antimicrobienne vis-à-vis cinq souches (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) et l'effet de leur association avec des antibiotiques de synthèse. Ainsi que l'étude des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Pour terminer, une conclusion sur l'ensemble de cette étude ainsi que les perspectives ont été dégagées.

Chapitre I
Synthèse
Bibliographique

I. Les plantes médicinales et aromatiques

1. Les plantes aromatiques

Les plantes aromatiques appartiennent à la fois au domaine des plantes médicinales et des matières premières industrielles d'origine végétale, et constituent des sources de substances naturelles complexes, destinées à apporter des caractères organoleptiques particuliers aux aliments. On peut citer : le basilic, le thym, le romarin et l'origan. Ces plantes aromatiques fraîches, séchées, ou conservées peuvent servir à l'assaisonnement des mets et également donner naissance à des formes galéniques particulières que ce soient les extraits végétaux, les huiles essentielles ou les oléorésines (Mailhebiau, 1994).

2. Les plantes médicinales

Les plantes médicinales comme l'ortie, la camomille, le pissenlit, la lavande...sont des drogues végétales qui possèdent des propriétés médicamenteuses (Anonyme, 1986).Elles sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire, en cosmétologie ainsi que dans la confection de boissons, soit nature, soit en préparation galénique ou encore sous forme de principe actifs comme matière pour l'obtention de médicaments (Anton et Lobstein, 2005).

I. Description botanique et propriétés des plantes étudiées

1. Le thym

1.1 Répartition géographique

Le genre *Thymus* est l'un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des Lamiacées (Naghbi et al., 2005). Il existe près de 350 espèces, sous espèces et variétés de thymus (Alaoui-Jamali et al.,2016) réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée. C'est un genre très répandu dans le nord ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud-ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte (Dob et al., 2006 ;Pirbalouti et al.,2015).Le nom *Thymus* vient probablement du latin *Thymus* qui signifie parfumé à cause de l'odeur agréable que la plante dégage ou du grec *thymos* qui signifie courage ou force (Pariente, 2001).

La région méditerranéenne d'une manière générale et l'Algérie en particulier avec son climat doux et ensoleillé est particulièrement favorable à la culture des plantes aromatique et médicinales .La production des huiles essentielles pourraient constituer à ce titre une source économique importante pour notre pays. Cette étude porte sur la famille des Lamiacées.

La famille des lamiacées est l'une des plus réponsues dans le règne végétal. C'est une famille d'une grande importance aussi bien sur son utilisation en industrie alimentaire et en

parfumerie qu'en thérapeutique. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant. Il est bien connu que les huiles essentielles extraites des plantes de cette famille possèdent des propriétés pharmacologiques tant sur le plan humain qu'industriel. De nombreuses propriétés leur sont conférées : anti-infectieuses, antispasmodiques, antalgique, digestives, cicatrisantes.... Les huiles essentielles par la diversité des constituants qui les composent, sont des substances très actives (Bekkalif et al., 2008).

1.2 Description botanique

D'après Quezel et Santa (1963) ; Haddouchi et al., (2009), le *Thymus fontanessii* est un arbrisseau à tiges dressées et robustes à feuilles oblongues, entières et glabres, de 10 à 12 cm de long et à fleurs blanches ou pales. Seules les feuilles sont utilisées pour l'extraction des HEs (figure 1).

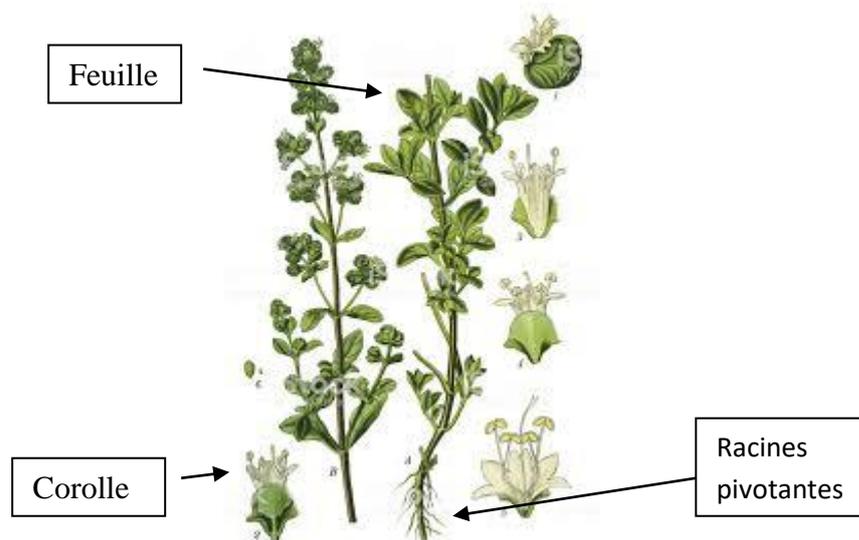


Figure 1 : Aspect morphologique de *Thymus fontanessii* (Iserin, 2001)

1.3 Classification

Au plan systématique le *Thymus fontanessii* se réfère à la classification botanique antérieure décrite par APG III (2009).

Règne : plantae

Sous règne : Plantes vasculaires

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Thymus*

Espèces : *Thymus fontanessii*

1.4 Huile essentielle du Thym

L'huile essentielle du thym est extraite principalement à partir des feuilles et des sommités fleuries dont les propriétés sont mises à profit en phytothérapie (**El Ouali Lalami et al., 2013 ; Ghilechnia 2016 ; Labiad et al., 2017**). La tige fleurie du thym contient en plus de l'HE des flavonoïdes (thymonine, cirsilinéol et 8-méthoxy-cirsilinéol) et des acides-phénols (notamment caféique et rosmarinique), des tanins et une résine (**Haraguchi et al., 1996**).

Selon la littérature, plus de 84 Huiles essentielles du genre *Thymus* ont été analysées de 1960 à 1989 (**Stahl- Biskup, 1991**). Son l'huile est parmi les 10 premières huiles essentielles du monde. Elle est antiseptique et utilisé pour soigner les infections pulmonaires comme l'asthme et la bronchite. Son action antiseptique s'est exercé également sur le système digestive et notamment en cas de diarrées (**Fadili et al., 2015 ; Dauquan et Abdullah, 2017**). L'huile essentielle du thym est une huile susceptible de présenter de grandes variations, qui sont principalement d'origine génétique et édaphoclimatiques, elle dépend également de la saison de cueillette (stade végétatif).

1.5 propriétés thérapeutique et culinaire

a) propriétés thérapeutique

D'après **Mohammedi et al., 2006**, la phytothérapie est basée sur l'utilisation des produits végétaux pour le traitement des maladies humaines.

Le thym est une plante qui a une longue tradition. Il est utilisé principalement dans le domaine médical pour ses propriétés antiseptique, anti-inflammatoire, antispasmodique et antitussive (**El Ouali Lalami et al., 2013 ; Labiad et al., 2017**) Il est par conséquent indiqué en cas d'infection respiratoires telles que la bronchite, la grippe, la toux et les maux de gorge ; dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels que : ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructation (**Ghannadi et al., 2004**). Il est utilisé également comme additif de bain préparé par décoction pour stimuler l'écoulement de sang vers la surface du corps humain, soulageant de ce fait la dépression nerveuse (**Özcan et Chlchat, 2004**).

b) propriétés culinaire

L'épice de thym est intensivement cultivé en Europe et aux Etats-Unis pour l'usage culinaire dans l'assaisonnement des poissons, des potages et des légumes (**Özcan et Chlchat, 2004**).

Le thym est utilisé comme un conservateur afin de prolonger la durée de conservation des poissons durant leur stockage (Selmi et Sadok, 2008 ; Barati et al. ; 2013).

2. L'Origan

2.1 Répartition géographique

L'origan a toujours joué un rôle important dans nos vies quotidiennes. Elle est employée en médecine traditionnelle et beaucoup d'autres utilisations.

Plante mellifère vivace, pousse de préférence sur les talus ensoleillés des pays du bassin méditerranéen (Richard, 1992 ; Rameau et al., 2009).

Le genre *Origanum* comporte plusieurs espèces aromatiques de la famille des Labiées, il est originaire du Sud Est méditerranéen et d'Asie occidentale (Vokou et al., 1993 ; Rameau et al., 2009).

Le nom origan dérive de deux mots grec ; *Oros*: montagne ou colline et *Ganos*: ornement, parce que cette plante préfère une altitude plus élevée dans le climat méditerranéen (Dubois et al., 2006).

2.2 Description botanique

L'origan est une plante herbacée ou sous-ligneuse à la base. Haut de 30 à 90 cm, il représente des tiges à section carrées portant une quarantaine de branches à feuilles vert foncé, petites et ovales. Les inflorescences sont en épis, eux-mêmes réunis en inflorescences composées (Richard, 1992 ; Teuscher et al., 2004 ; Rameau et al., 2009).

Le calice de l'origan est tubuleux à cinq dents courtes, bilabié ou non. La corolle quant à elle est blanche, rosée ou bien violette (Quezel et Santa, 1963 ; Pharmacopée européenne, 2011).

2.3 Classification

Le genre *Origanum* inclut des arbustes nains dicotylédones, des plantes annuelles, bisannuelles ou vivaces qui se reproduisent dans le secteur chaud et montagneux.

D'après la classification d'APG III, l'origan appartient :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliospida

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Origanum*

Espèce : *Origanum floribundum*

2.4 Huile essentielle de l'origan

Tous les origans renferment en quantité variable une huile essentielle fortement aromatique (Garland, 1980 ; Vale-Silva et al., 2011). En moyenne, on extrait environ 1,8 % d'HE à partir des feuilles et des sommités fleuries. Cependant, la qualité et la quantité de l'huile extraite varient selon la génétique de la plante, stade végétatif, les procédés d'extraction et surtout les conditions de l'environnement (Padulosi, 1997 ; Vale-Silva et al., 2011).

2.5 Propriétés thérapeutique et culinaire

a) Propriétés thérapeutique

L'huile essentielle d'origan possède un effet antiseptique, est légèrement tonique et digestive. Elle provoque la menstruation, apaise les nerfs, soulage les maux de tête et de dents, elle aide aussi à lutter contre les insomnies.

L'origan est aussi un anti-inflammatoire, anti diabétique, antispasmodique expectorant, diurétique et sudorifique (Leyva-lopez et al., 2017). C'est un bon stimulant de l'appareil digestif, il est particulièrement utile dans diverses affections des voies respiratoires (Bronchique, trachéo-bronchite) elle calme la toux en favorisant l'expectoration.

b) Propriétés culinaire

Différentes parties de la plante (feuilles, sommités fleuries, huiles essentielles) sont actuellement employées en industrie alimentaire en tant qu'épices. Elle est considérée comme étant l'une des épices les plus répandues dans la région méditerranéenne (Carmo et al., 1989 ; Baser et al., 1992,1993 ; Meyers,2005).

II. Les huiles essentielles

1. Généralités

Les huiles essentielles sont des substances odorantes et volatiles, non grasses, extraites d'un végétal sous forme liquide (Couic-Marinier et Lobstein, 2013). Elles sont synthétisées par des plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires (Bakkali et al., 2008). La plupart des

végétaux renferment des huiles essentielles, mais habituellement en très petite quantité. Seules les plantes dites « aromatiques » en produisent en quantité suffisante (**Lardry et Haberkorn, 2007**).

Les huiles essentielles peuvent être accumulées dans tous les parties d'organes végétaux par exemple des fleurs (d'oranger, la rose, la lavande) mais aussi des feuilles (citronnelle, l'arbre eucalyptus, laurier noble) et bien que cela soit moins habituel, dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose, camphrier, santal), des racines (vétiver), des rhizomes (curcuma, gingembre), des fruits secs (anis, badiane, persil), des graines (muscade) (**Anonyme, 2008**).

La biosynthèse et l'accumulation des molécules aromatiques sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées. Ces structures, sont souvent situées sur, ou à proximité de la surface de la plante et elles varient selon les familles botaniques, poils sécréteurs externes dans le cas des *Labiées* et des *Géraniacées*, cellules sécrétrices dans le cas des *Lauracées*, des *Magnoliacées* et des *Pipéracées*, poches sécrétrices dans le cas des *Myrtacées* et des *Aurantiacées* et canaux sécréteurs pour les *Ombellifères* et les *Conifères*(figure 1) (**Haddouchi et Benmansour, 2008**).

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction de ces substances. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau, est le procédé le plus pratiqué dans l'industrie des arômes.

Le choix de la technique dépend principalement de la matière première. Ce choix conditionne les caractéristiques de l'huile essentielle, en particulier : viscosité, couleur, solubilité, volatilité, enrichissement ou appauvrissement en certains constituants (**Haddouchi et Benmansour, 2008; Anonyme, 2008**).

2. Localisation des parties sécrétrices des Huiles essentiels

Parmi les espèces végétales (800 000 à 1 500 000 selon les botanistes) 10 % seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique par l'intermédiaire de poils, poches ou canaux sécréteurs (**Bruneton 1993**). Les genres capables d'élaborer les constituants des huiles essentielles sont répartis dans un nombre de familles limité ; *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae*, ... (**Durvele, 1930, Bruneton, 1999**).

Les teneurs en huiles essentielles sont généralement très faibles, à l'exception de celle du bouton floral de giroflier où le rendement en huile essentielle atteint largement les 15% (**Makhlouf, 2002**).

3. Composition chimique

La composition des huiles essentielles varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation (Merghache *et al.*, 2009 ; Boukhatem *et al.*, 2010 ; Sui *et al.*, 2012; Karamanos et Sotiropoulou, 2013; Zaouali *et al.*, 2013 ; Wu *et al.*, 2013).

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par la spectrométrie de masse (SM). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (Boukhebt *et al.*, 2011 ; Darriet-Giudicelli, 2011).

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes qui peuvent contenir environ 20 à 60 composants aux concentrations différentes. Elles sont cependant caractérisées par 2 à 3 composés majoritaires présents relativement en forte concentration, de 20 à 70% par rapport aux autres constituants présents parfois sous forme de traces et qui confèrent aux HES leurs propriétés thérapeutiques (Bakkali *et al.*, 2008).

La plupart des composants des HEs sont inclus dans deux groupes selon la voie métabolique empruntée : les composés terpéniques (hydrocarbures) et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (composés oxygénés), les deux sont synthétisés à travers deux voies métaboliques séparées: la voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique pour les terpènes et la voie de l'acide shikimique pour les dérivés du phénylpropane (Amlan, 2011 ; Djilani et Dicko, 2012).

4. Fonction biologique

Bien que de nombreuses hypothèses aient été avancées pour expliquer les raisons de la synthèse de l'essence par la plante, nul ne sait avec exactitude les raisons pour lesquelles la plante fabrique son essence (Richard, 1992 ; Iammoudi, 2008; Ferhat *et al.*, 2009). Mais ce qui est probable, c'est que le rôle des HE au niveau du matériel végétal est intimement lié à leur situation.

Par exemple, ces huiles confèrent un rôle répulsif vis-à-vis des prédateurs et attractifs pour les insectes pollinisateurs. Un feuillage renfermant une teneur élevée en essences végétales (Laurier) le protège des herbivores. La présence des HE au niveau des racines, des écorces, du bois, confère à la plante un effet antiseptique vis-à-vis des parasites telluriques. Certains terpènes linéaires interviennent dans le métabolisme de la plante, ils peuvent être employés comme source énergétique (Guignard, 1996).

5. Toxicité

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées (**Pibiri, 2006**).

5.1 Toxicité par ingestion

En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL 50 supérieures à 5 g/kg. En ce qui concerne la sarriette et l'origan la toxicité est un peu plus élevée autour des 1,4 g/kg (donnée observée chez l'animal) (**Bruneton, 1999**). Chez l'homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, les plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'huiles essentielles : girofle (eugénol), eucalyptus et gaulthérie (salicylate de méthyl) (**Pibiri, 2006**).

5.2 Toxicité dermique

Le large usage que font la parfumerie et le cosmétique de ces huiles essentielles a suscité de nombreux travaux sur leur éventuelle toxicité (aiguë ou chronique) par application locale. Tous les ouvrages traitant des huiles essentielles donnent des concentrations maximales, les évictions et mises en garde nécessaires. Le thym, l'origan, la sarriette sont connues pour leur pouvoir irritant, la cannelle est dermocaustique et allergisante pour les peaux sensibles (**Pibiri, 2006**).

5.3 Toxicité selon la composition

Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxiques. Les huiles essentielles de thym et de lavande selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la lavande (**Inouye, 2003**), sont cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois. Par ailleurs, des huiles essentielles de différentes variétés d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines dérivées de cancers (**Sivropoulou et al ., 1996**).

6. Utilisation des huiles essentielles

Les domaines d'application des huiles essentielles diffèrent selon la plante dont elles proviennent mais surtout de la partie du végétal dont elles sont extraites (la fleur, la feuille, les

racines et la graine). D'une manière générale, les essences extraites des racines sont reconnues pour leur action sur le système nerveux, celles extraites des graines et des fleurs pour leur impact sur l'ensemble du système digestif et celles issues des feuilles pour leur bien fait sur les systèmes respiratoire et cardiaque. A cet effet, les HEs sont recommandées en usage antibiotique, antiviral, antiseptique, fongicide, cicatrisant, digestif, anti-inflammatoire, sédatif, etc. (**Richard, 1992**).

6.1 En industrie Agro-alimentaire

Les HEs possèdent des profils de composition chimique différents, elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**Conner, 1993**). Elles sont également employées comme agents aromatisants naturels. Selon **Bruneton (1993)**, la part des HE dans l'aromatisation ne cesse de croître au dépend des composés aromatiques de synthèse.

7. Techniques d'extraction

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique (**Garnero, 1977; Bego, 2001**). Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales (Annexe V), cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants.

VI. Activité antimicrobienne

1. Historique

Empiriquement reconnues depuis des siècles, la confirmation scientifique de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est récente. Elle ne date que du début du siècle dernier avec les travaux du Dr Gattefossé, le père de l'aromathérapie en France. Depuis ce temps, l'utilisation des huiles essentielles s'est développée jusqu'à devenir depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses.

De nombreuses études traitent de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès d'aromathérapie scientifique.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles se trouve à la base des médecines dites alternatives, de nombreux procédés utilisés dans la conservation des produits alimentaires crus ou

cuits, de substances actives exploitées dans les produits pharmaceutiques. Cette activité a été utilisée dernièrement pour la conservation du patrimoine bibliographique des musées (**De Billerbeck, 2000**), et elle est naissante pour traiter la qualité de l'air dans les bâtiments (**Pibiri et al., 2001**).

2. Activité antibactérienne et mécanismes d'action des huiles essentielles

Les HEs ont un effet sur la croissance des bactéries. Elles agissent en empêchant leur multiplication, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Ces dernières attirent actuellement beaucoup d'attention parce qu'elles ont montré une activité contre les pathogènes résistants aux antibiotiques, tels que les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM), les β -Lactamases à spectre élargi (BLSE) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (**Tohidpour et al., 2010 ; Warnke et al., 2013**).

Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les HEs, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (**figure 2**).

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases (**Calsamiglia et al., 2007 ; Djilani et Dicko, 2012 ; Goetz et Ghedira, 2012**) :

- ✓ Attaque de la paroi bactérienne, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- ✓ Acidification de l'intérieur de la cellule provoquant la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines, ce qui bloque la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;
- ✓ Destruction du matériel génétique, ce qui cause la mort de la bactérie.

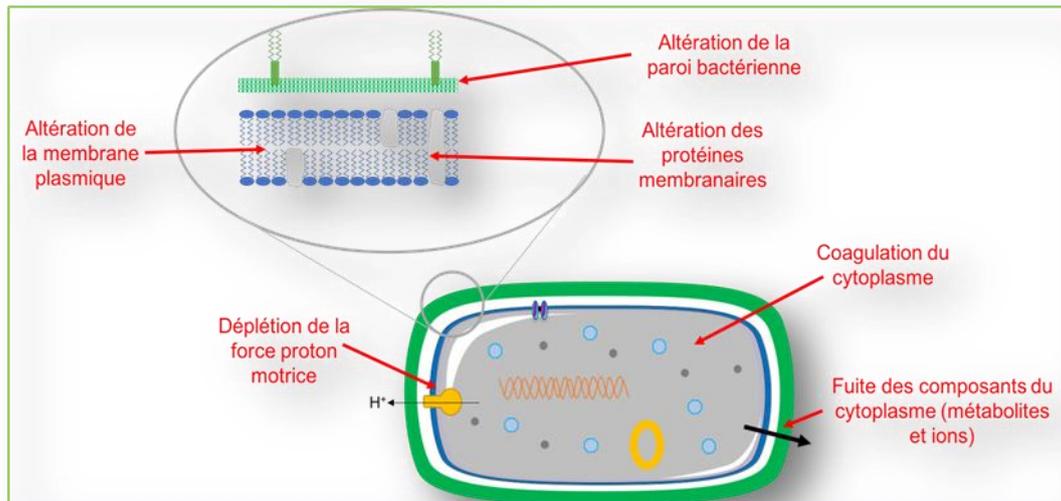


Figure 2 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne
(Chouhan *et al.* ,2017)

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HEs

La technique de détermination de l'activité antimicrobienne des HE et des extraits a une grande influence sur les résultats. Les difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants de ces huiles dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à des faibles concentrations et des problèmes de standardisation des méthodes (Hulin *et al.*, 1998).

3.1 Principales méthodes

Les différents protocoles peuvent être classés selon :

- ✓ Le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'HE ou d'extrait (liquide, solide ou gazeux) ;
- ✓ La nature du contact de l'HE au de l'extrait avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant.

a) Techniques par contact direct

Elles consistent à mettre en contact l'HE ou les extraits avec les microorganismes, puis d'observer la croissance de ces derniers. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé ou liquide (Figure 3). L'aromatogramme ou encore méthode des disques est l'une de ces méthodes. Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester. Les disques sont ensuite déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension bactérienne à étudier. Après incubation, les bactéries se développent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'HE ou d'extrait suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée

« zone d'inhibition ». Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible au produit testé. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (Fauchère et Avril, 2002).

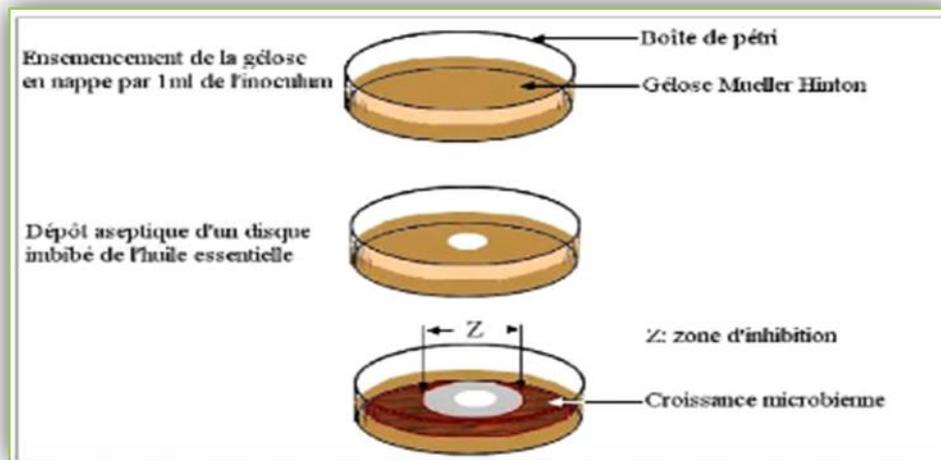


Figure 3 : Illustration de la méthode des aromatochromes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).

b) Micro-atmosphère

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience (Figure 4). Il se produit alors une évaporation des substances volatiles dans la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de l'inoculum (Hulin et al. 1998). L'inconvénient de cette méthode c'est qu'elle ne montre que l'activité des constituants volatils à température d'incubation, et non de l'HE elle-même.

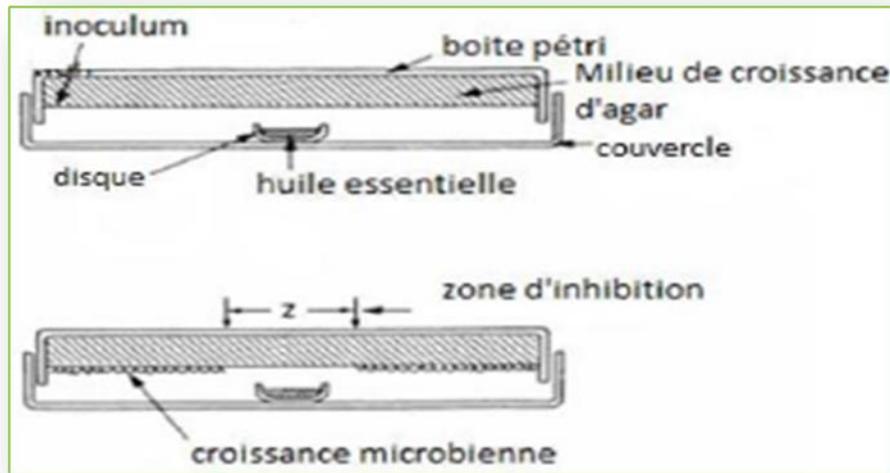


Figure 4 : Illustration de la méthode des micro-atmosphères (Zaika, 1988).

3.2 Propriétés antibactériennes

les plantes n'ont pas un système immunitaire proprement dit qui peut identifier une infection spécifique, leurs propriétés antimicrobiennes sont généralement efficaces contre une large gamme de microorganisme, ces propriétés sont utiles pour les infections chez les humains (Remmal, 1993 ; Chami, 2005 ; Caillet et al., 2009).

3.3 Propriétés antifongiques

La présence et la croissance de champignons dans les aliments peuvent causer des pourritures qui auront pour effets de diminuer la qualité et/ou la quantité de l'aliment. En plus, les mycotoxines secrétées occasionnent de graves atteintes à la santé humaine et animale, le pouvoir antifongique des huiles essentielles des plantes médicinales a été mis en évidence par de nombreux chercheurs contre les champignons pathogènes et opportunistes (De Bellerbeck, et al., 2002)

III. Les antibiotiques

1. Définition des antibiotiques

Les antibiotiques, du grec anti « contre », et bios « la vie », sont des substances bioactives produites par des bactéries du sol et certains champignons, dont l'activité se manifeste à très faibles doses et d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard d'autres microorganismes. Les antibiotiques ont une origine naturelle s'ils sont extraits

d'organismes vivants. Ils peuvent aussi être obtenus par synthèse chimique totale ou partielle. Ils sont utilisés pour détruire des bactéries responsables d'une infection au sein d'un organisme (Nauciel *et al.*, 2005 ; Ramdani *et al.*, 2011).

2. Mécanismes d'actions

L'antibiotique idéal agit en fonction de sa concentration sur une fonction vitale de la bactérie sans affecter les cellules de l'hôte. Les antibiotiques inhibent ou tuent les bactéries. Ils peuvent agir ensemble de façon synergique, antagoniste ou indifférente. (Clive et Coll, 1999). On distingue donc deux types d'antibiotiques : les bactéricides, qui tuent les bactéries, les bactériostatiques, qui freinent ou inhibe la multiplication des bactéries.

2.1 Classification

On peut classer les antibiotiques et agents chimio thérapeutiques de synthèse selon plusieurs critères. Les antibiotiques actuels peuvent être groupés en plusieurs familles possédant un certain nombre de caractères communs : composition chimique, spectre d'action similaire, mécanisme d'action identique, résistance croisée, effets secondaires rapprochés (Maloine, 1979 ; Yala *et al.*, 2001).

a) Spectre d'action

Il est différent pour chaque famille d'antibiotique. Aucun antibiotique n'est efficace contre toutes les bactéries, mais les mêmes germes peuvent être sensibles à plusieurs antibiotiques à la fois (Maloine, 1979). On trouve des antibiotiques à spectre très large, large, moyen ou étroit.

b) Type d'action

Les antibiotiques sont classés en bactériostatiques et bactéricides. Les antibiotiques bactériostatiques entraînent une inhibition de la croissance bactérienne sans détruire les germes. Par contre, les antibiotiques bactéricides entraînent la lyse puis la mort plus au moins rapide des germes et sont souvent utilisés dans les infections sévères (Netter et Rouvex, 1990).

c) Modes d'actions

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le spectre d'activité et le mécanisme d'action (Yala *et al.*, 2001). Selon leur mode d'action. Les antibiotiques sont classés en 5 groupes :

- ✓ L'Inhibition de la synthèse de la paroi : Bétalactamines, les Glyco et les Lipoglycopeptides : (Fosfamylicines).

- ✓ L’Inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN) : les quinolones, nitro-amidazolés, ansamycines, sulfamides, benzylpyrimidines.
- ✓ Inhibition de la synthèse protéique : ces antibiotiques agissent sur les sous unités 50S et 30S en bloquant la synthèse protéique (**Canu et Petter, 2001**).
- ✓ Modification du métabolisme par interférence avec les métabolites : les sulfamides empêchent la synthèse de l’acide folique coenzyme indispensable des vitamines et des acides nucléiques produit à partir de l’acide para-amino-benzoïque (**Canu et Petter, 2001**).
- ✓ Inhibition de la réplication de l’ADN.

d) Origine

Les antibiotiques et les agents chimio thérapeutiques produit par les microorganismes ont plusieurs origines. Bactéries non filamenteuse : *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*. Bactéries filamenteuses : *Stryptomycetes* (actinomycètes) tous les autres antibiotiques, la même souche de *Stryptomycetes* peut produire plusieurs antibiotiques (**Maloine, 1979**). Penicillium : pénicilline, céphalosporine, griséofuline.

e) Composition chimique

D’après **Maloine, (1979)**, la composition chimique peut être : dérivés d’un seul acide aminé : chloramphénicol, thiamphenicol, cycloserine, dérivés de deux acides aminés sous forme de peptide cyclique, peptide cycle lactonique, complexe glycoprotéique ou dérivés de l’acétate : stéroïdes, polyènes

3. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques s'est principalement développée durant les 50 dernières années par l'utilisation répandue et fréquente des antibiotiques favorisant une pression de sélection (**Matyara et al., 2008**).

Plusieurs mécanismes de résistance ont été mis en évidence chez les bacilles Gram négatif qui sont, par ailleurs, responsables de la majorité des infections hospitalières (60 %) et sont de plus en plus multi résistants (**Bolla et al., 2011**).

3.1 Définition

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique donné, quand elle est capable de se développer en présence d’une concentration en antibiotique significativement plus élevée que celle habituellement active sur les souches de cette espèce (**Leclerc et al., 1995**).

On distingue deux types de résistance aux antibiotiques, naturelle et acquise.

3.2 Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les souches de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) (Lozniewski et al., 2010).

3.3 Résistance acquise

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. Elle résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce, et elle a été observée dès le début de l'antibiothérapie (Lozniewski et al., 2010).

3.4 Mécanismes génétiques de la résistance

Une bactérie peut acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique. (Lozniewski et al., 2010).

a) Résistance chromosomique

Elle résulte d'une mutation. C'est un phénomène rare, dû au hasard et indépendant, Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques. (Lozniewski et al., 2010).

b) Résistance extra-chromosomique (plasmides)

Deux faits expliquent l'importance de la résistance plasmidique :

La résistance plasmidique est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie.

De nombreux plasmides de résistance sont conjugatifs ou mobilisables ce qui permet un transfert horizontal ; ces transferts sont à l'origine d'une dissémination très importante de la résistance au sein des populations bactériennes (Lozniewski et al., 2010)..

Chapitre II

Matériel et méthodes

Notre travail qui porte sur l'étude de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles (*Thymus fontanesii*, *Origanum floribundum*) a été réalisé au sein d'une unité de la filiale BIOTIC du groupe pharmaceutique SAIDAL, située à Gué de Constantine sur une période de 1 mois et demi (Avril-Mai).

I. Matériel :

1. Matériel végétal :

Le matériel végétal était constitué des parties aériennes des plantes de la famille des lamiacées *Thymus fontanesii* et d'*Origanum floribundum*, (tableau 2).

Tableau 2 : identité des espèces étudiées (*Thymus fontanesii* et *Origanum floribundum*)

Espèce végétale	Famille botanique	Provenance	Partie utilisé	Substance extraite	Date d'extraction
<i>Thymus fontanesii</i>	Lamiacées	Sétif	Feuilles	Huile essentielle	Mai 2019
<i>Origanum floribundum</i>	Lamiacées	Herbier Wilaya de Blida	Feuilles	Huile essentielle	Mai 2019

2. Matériel biologique :

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du *Thymus fontanesii* et l'*Origanum floribundum*, nous avons utilisé cinq souches (*Escherchia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) se trouvant au CRD-SAIDAL, filiale BIOTIC, à Baraki, Alger, pour leur fréquence élevée de contamination des denrées alimentaires. (tableau 3).

Tableau 3 : Identification des souches microbiennes utilisées

La souche	Espèce	Gram	Reference	Famille
Bactéries	<i>Escherchia coli</i>	-	ATCC8739	Enterobacteriaceae
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC6538	Micrococcaceae
	<i>Bacillus subtilis</i>	+	ATCC6633	Bacillaceae
Levure	<i>Candida albicans</i>	/	ATCC10231	Cryptococcaceae
Moisissures	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	/	ATCC16404	Trichocomaceae

3. Matériels non biologique

Le matériels non biologique utilisé dans le laboratoire de l'unité de Saidal est représenté en **Annexe II**

4. Les antibiotiques

L'antibiotique et l'antifongique utilisés sont le Primazol®400/80mg qui est un antibiotique de synthèse pour les 3 bactéries (*E. coli*, *S.aureus* et *B.subtilis*) et lamidaz 250 mg qui est un antifongique utilisé pour (*C.albicans* et *A.brasiliensis*).

Primazol®400/80mg

C'est un antibiotique appartenant à la classe des sulfamides, connu sous le nom commercial Bactrim® (laboratoires Roche) et d'Eusaprim®, (Wellcom). Primazol® est la dénomination de marque ou de spécialité retenue par SAIDAL.

Lamidaz 250 mg

C'est est un médicament antimycosique ou antifongique. Sa DCI est la terbinafine de chlorhydrate. Il est indiqué dans le traitement de certaines infections provoquées par des champignons ou des levures parasites (mycoses), y compris les mycoses des ongles (onychomycoses) et les candidoses cutanées. Le LAMIDAZ se présente sous forme de comprimés blancs sécables de diamètre 11mm. La dose unitaire est de 250mg ; la dose centésimale est de 86.61% et la durée de convention est de 36 mois.

II. Méthodes

II.1 Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles des parties aériennes des deux plante a été réalisée par hydrodistillation dans un appareil de type clewenger au niveau de laboratoire du CRD –SAIDAL (**figure 5**) .

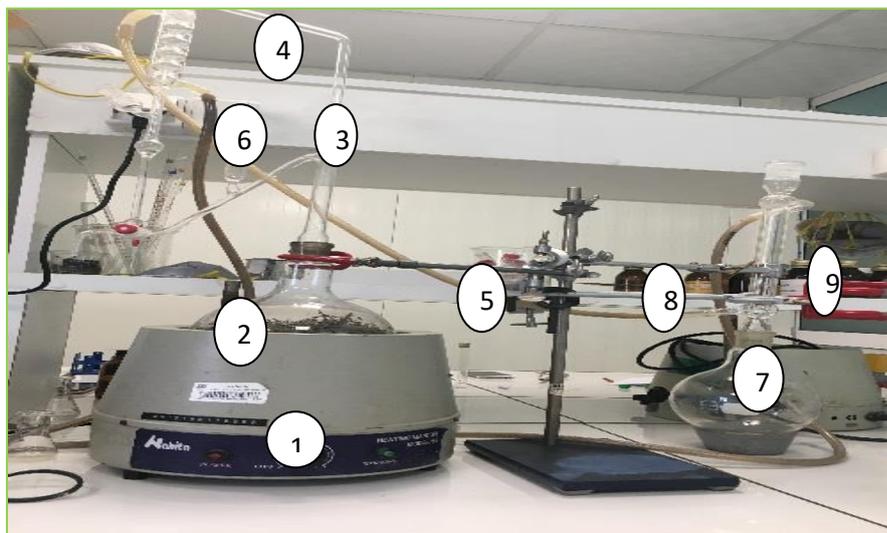


Figure 5 : Dispositif de l'hydrodistillation de type clewenger

- | | | |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 1 : Chauffe ballon. | 4 : Réfrigérant. | 7 : Ampoule à décanter. |
| 2 : Ballon 2 litres. | 5 : Entrée de l'eau froide. | 8 : Supports métallique. |
| 3 : Colonne en verre. | 6 : Sortie de l'eau chaude. | 9 : Robinet. |

Cette technique est réalisée selon la méthode de la pharmacopée européenne (2014). L'opération consistait à introduire, séparément, à chaque essai, dans un grand ballon en verre contenant une quantité suffisante d'eau distillée 200g de masse végétale séchée et coupée, en petit morceaux de 3cm de long,

Le mélange a été porté à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huiles essentielles passaient à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où se réalisait la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulaient dans l'ampoule à décanter. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. Par la suite, l'huile essentielle a été récupérée dans un flacon en verre opaque, puis conservée, à l'abri de la lumière et de l'air, au réfrigérateur à 4°C pour éviter son altération. la durée de l'extraction a été réalisée en deux heures.

La durée d'extraction de l'HE dépend de l'état physique de la plante (fraîche, broyée, séchée), de la composition de l'huile essentielle et de la vitesse de la distillation.

II.2 Rendement d'extraction

Le rendement en huile essentielle est la première quantification à faire ; il est exprimé en millilitre pour 100 grammes de matière végétale sèche.

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traiter (**Anonyme, 2014**).

$$RHE(\%) = \frac{MHE}{MS} \cdot 100$$

D'où :

R : Rendement en extraits fixes en g /100g de matière sèche

MHE: quantité d'extraite récupérée exprimée en g;

MS : quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

Les huiles essentielles sont recueillies et conservées au réfrigérateur à 4°C dans des bouteilles sombres pour les préserver de la chaleur.

III. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est de déterminer le taux d'inhibition de la croissance des microorganismes (bactéries, levures..) par la méthode de diffusion sur milieu gélosé (méthode d'aromatogramme (**Ozcan et al. 2003**)). Elle permet d'étudier la sensibilité des germes aux huiles essentielles extraites. Les tests réalisés sont validés par le laboratoire de microbiologie de Biotic-SAIDAL. (**Pharmacopée Européenne, 2002**).

1. Principe

Le principe consiste à déposer un disque stérile de papier buvard de diamètre 6 à 9 mm, imprégné d'une concentration d'huile essentielle, sur une gélose (MULLER Hinton et Sabouraud) coulée dans des boîtes etensemencée de microorganismes. Le milieu utilisé variait en fonction des microorganismes.

Les bactéries → milieu MULLER Hinton

Les levures et les champignons → milieu Sabouraud

L'huile essentielle diffusait à partir du centre du disque vers la périphérie, en décrivant un gradient de concentration d'huile essentielle.

Pour les bactéries, après d'incubation, il se produit un halo d'inhibition circulaire. Alors que pour les levures et les champignons, il fallait attendre 48h d'incubation pour que le halo d'inhibition se produise. La lecture des résultats se faisait par la mesure du diamètre en (mm) de la zone d'inhibition.

2.1 Purification des souches microbiennes

Les souches bactériennes isolées à partir des souches secondaires préparées et identifiées par les analystes de SAIDAL. Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur gélose Muller-Hinton favorable à leur croissance pour assurer leur purification. L'incubation s'effectuait à 37 °C pendant 24h .Les levures et les champignons sont cultivées dans un milieu Sabouraud. L'incubation était réalisée à 25 °C pendant 1 semaine.

2.2 Préparation des suspensions bactériennes

Les germes à tester sontensemencées dans des boites de pétri contenant le milieu de culture (gélose de Muller Hinton, Sabouraud). L'incubation durait 24 h pour les bactéries et 48 h pour les levures afin d'obtenir des cultures jeunes et des colonies isolées. Pour la préparation de l'inoculum, il a été prélevé 2 à 3 colonies qui ont été mises dans 5 ml d'eau physiologique stérile. Une fois, l'opération d'homogénéisation réalisée, la densité optique relevée à 625 nm. Cette dernière est justifiée entre 0.08 à 0.10, Elle correspond à une concentration de 10^7 - 10^8 germes/ml (10^8 ufc/ml).l'ajustement se faisait par l'ajout de la culture si la densité était trop faible ou de l'eau physiologique si la densité était trop élevée (**figure 6**).



Figure 6 : Les suspensions microbiennes dans l'eau physiologique stérile

2.3Préparation des disques stériles

Les disques stériles ont été fabriqués à partir de papier buvard de diamètre 6 à 9 mm.

Les milieux de culture Muller Hinton et Sabouraud ont été préalablement préparé (Annexe I), le milieu Muller Hinton pour les bactéries, et le milieu Sabouraud pour les levures et champignons sont fondue dans un bain-marie à 95°C. Et couler aseptiquement dans des boites de

pétri de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte. L'opération était réalisée à deux reprises par souche.

2.5 L'ensemencement des germes

L'ensemencement effectué par écouvillonnage (**figure7**), à partir de l'inoculum. Après les opérations de frottement à l'intérieur de la boîte, sur la totalité de la surface gélosée pour former des stries serrées, la boîte de Pétri tournoyée à 180°c après chaque application pour obtenir une bonne distribution de l'inoculum.

Les souches bactériennes et les souches fongiques servent à ensemencer les milieux de culture Muller –Hinton et Sabouraud. Ils sont incubés à 37°c (24 heures pour les bactéries et 48 heures pour les levures).



Figure 7 : Ensemencement des germes par écouvillonnage.

2.6 Dépôt des disques stériles

Les disques de papier filtre stérilisés sont pris à l'aide d'une pince stérile, puis déposés à la surface de gélose ensemencée par le germe en question imprégné avec 10 µl d'huiles essentielles à tester. L'huile essentielle (ou extrait de plante) diffusait à 30 min, puis les boîtes de pétri sont incubées à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et 48 h pour les levures. , L'opération est reprise deux fois par souche (**Anonyme, 2014**).

2.7 Expression des résultats

Après incubation, l'activité antimicrobienne se traduit par un halo clair translucide autour du disque indiquant l'inhibition du développement microbien mesuré à l'aide d'un pied à coulisse en incluant le diamètre du disque. La présence ou l'absence d'un halo permet d'expliquer la

sensibilité ou la résistance des germes vis-à-vis des échantillons testé (huiles essentielles et ou extraits), selon une échelle de notation symbolique allant de 10mm a 25mm (**tableau 4**) (**Sadou et al., 2015**).

Tableau4 : échelle de l'activité antimicrobienne en fonction de diamètre de la zone d'inhibition

Activité d'inhibition	Diamètre de la zone d'inhibiton
Action inhibitrice très efficace	ZI \geq 25 mm (+++)
Action inhibitrice importante	16 \leq ZI<25mm (++)
Action inhibitrice intermédiaire	10 \leq ZI<16 mm (+)
Sans action inhibitrice	ZI<10 mm (-)

IV. Test d'antibiogramme du Primazol et Lamidaz

Les tests de sensibilité aux antibiotiques permettent de dresser le profil de résistance d'une souche bactérienne donnée, nécessaire à l'antibiothérapie. Dans notre travail, le principe d'effectuer cette étape est de tester l'efficacité du Primazol et lamidaz par rapport à quelques souches de références.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne est réalisée par la méthode de diffusion de disques imbibés d'environ 10 μ l d'une solution contenant du Primazol et LAMIDAZ.

Les souches de références : Ces souches sont conservées à l'état lyophilisé.

a) Préparation de milieu de culture dans des boîtes

Les milieux utilisés dans notre étude sont les milieux Mueller Hinton et Saboraud. Ils sont fondue dans un bain Marie réglé à 100°C et coulé aseptiquement dans des boites de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte (deux boites par souche), puis refroidissement et solidification sur pailleasse.

b) Préparation de la solution à tester

Sous une hotte à flux laminaire avec des conditions d'aseptie, le comprimé Primazol et le comprimé de Lamidaz sont dissout dans 5 ml d'eau physiologique stérile et agités pendant quelques secondes à l'aide d'un vortex.

c) Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîte de Pétri. L'écouvillon est trempé dans la suspension microbienne (bactéries et champignons) ensuite ensemencé sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas des stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée.

Les disques imprégnés d'extrait sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. Ils diffusent 30 mn à 4°C. Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 24h à 37°C.

d) Lecture des résultats

La lecture des antibiogrammes est faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions autour des disques. Présence de zone d'inhibition autour du disque : présence d'activité inhibitrice. (Anonyme, 2016) (tableau 5).

Tableau 5 : Diamètre des zones d'inhibitions des antibiotiques (EUCAST 2016).

Organismes cibles	Valeurs mesurée	Limites acceptables (EUCAST 2016)
<i>Esherchia coli</i>	26 mm	23-29 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	29 mm	26- 32 mm
<i>Bacillus subtilis</i>	28 mm	25-31 mm
<i>Candida albicans</i>	24 mm	23-29 mm
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	29 mm	26-32 mm

V. Etude de l'association « huile essentielle / antibiotique » par la méthode des disques

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de l'association HEs/ATBs est celle de diffusion sur milieu solide préconisée par **Halawani (2009)** ; **Mandal et al., (2010)**; **Toroglu, (2011)**.

Un disque d'antibiotique de 6 mm de diamètre est déposé au centre de chaque boîte Muller Hinton préalablement ensemencée (un disque par boîte). A l'aide d'une micropipette, 10 µl d'HE sont déposés sur chaque disque d'ATB. Les boîtes sont laissées diffuser à 4°C pendant 2 h puis incubées à 37°C pendant 24h. Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en mm. Le résultat retenu correspondait à la moyenne des trois essais ;

Les données sont analysées comme suit :

- **Indifférence** : les deux zones d'inhibition de l'HE seule et de l'association HEs/ATBs restaient inchangées.
- **Antagonisme** : la zone d'inhibition de l'association HEs/ATBs fut moins importante que celle de l'HE toute seule.
- **Synergie** : la zone d'inhibition de l'association HEs/ATBs était plus importante que celle de l'HE toute seule.

VI. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne

1. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles

L'évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles consiste à la Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices CMI sur les microorganismes (bactéries et levures) soumises aux contacts des huiles essentielles grâce à la méthode de dilution en milieu solide c'est-à-dire par le biais de disques absorbants pour les bactéries et les levures.

Dans certaines situations, la réponse qualitative ne suffisait pas : la détermination précise de la CMI était indiquée pour mieux préciser le niveau de l'activité des molécules CMI.

1.1 Principe

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle aucune croissance visible à l'œil nu n'est observée (**Skandamis et Nycha ; 2001**). Cette méthode permet

la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations d'extrait dilué dans l'eau physiologique.

1.2 Préparation de l'inoculum :

De la même manière de diffusion sur milieu gélosé, on prépare l'inoculum pour cette méthode de diffusion par disque. La suspension bactérienne est reprise par des dilutions successive dans un tampon phosphate salin (PBS) pour l'obtention d'une densité initiale de 10^5 CFU (unités formant colonies)/mL et 10^6 CFU/mL pour chacune des souches testées.

a) Préparation de l'émulsion d'HE

La solution mère huile essentielle de thym et d'Origan doit être au 0.2/10 (2%). Elle a été préparée dans M-H (pour les bactéries) et SAB (pour les levures). Une série de dilution de chaque produit est préparée à des concentrations allant de 2% à 0.03% pour l'HE. La réalisation des dilutions se fait comme suite :

1 ml d'HE est dilué dans 50 ml de milieu M-H (bactéries) ou SAB (levures), maintenu en surfusion, dans un premier flacon ce qui donne une dilution de 2% (solution mère) ; verser la moitié du premier flacon dans un deuxième flacon et ajuster avec 25 ml de milieu pour la dilution 1% procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0.03%. Les mélanges de chaque dilution sont immédiatement repartis dans deux boîtes de Pétri rondes (90 mm de diamètre) à raison de 12.5 mm de milieu par boîte. La gamme de concentration finales ainsi obtenue correspond à 2% ; 0.5% ; 0.25% ; 0.06% ; 0.03%.

b) Dépôt des disques

Après solidification, les disques stériles en cellulose de 0.6 cm imbibés de la suspension bactérienne ou fongique (levures) sont déposés à la surface du milieu gélosé contenant ou pas l'HE. Chacune des boîtes a étéensemencée par deux à trois (2-3) espèces différentes. Tous les essais sont réalisés deux fois Les boîtes de Pétri (témoins et essais) sont mises en incubation pendant 24 heures à 37°C pour les bactéries et pendant 72 heures à 25°C pour les levures. La lecture des résultats se fait visuellement par l'observation de la croissance ou de l'inhibition de la croissance du microorganisme antimicrobien testé par rapport à la croissance sur une boîte témoin sans extrait. La CMI est définie comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

Chapitre III
Résultats
et
Discussion

I. Résultats et interprétation

I.1 Détermination des rendements d'extraction des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle des deux plantes est exprimé en millilitre d'HE par rapport à 100 grammes de matière végétale sèche.



Thymus fontanessii et *origanum floribundum*

Les rendements obtenus des parties aériennes des deux plantes figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 6 : Rendements d'extraction des H.Es exprimés en % (ml/100g de MV)

H.E des plantes	Rendements %
<i>Thymus fontanessii</i>	2
<i>Origanum floribundum</i>	4.3

D'après le **tableau 6**, le rendement en H.E de *Thymus Fontanessii* est de 2 % par contre celui de l'*Origanum floribundum* est de 4.3 %.

Selon **Bousbia** et **Chikhoun(2004)**, ces différences de rendement sont dues à plusieurs facteurs à savoir l'origine géographique, l'écologie, température et humidité, espèce végétale, stade de croissance, période de cueillette, conservation du matériel végétal et la méthode d'extraction.

I.2 Activité antimicrobienne des l'huiles essentielles (*Thymus fontanessii* et *Origanum floribundum*)

Les résultats du test antimicrobien des HEs sont illustrés dans la **figure 8**

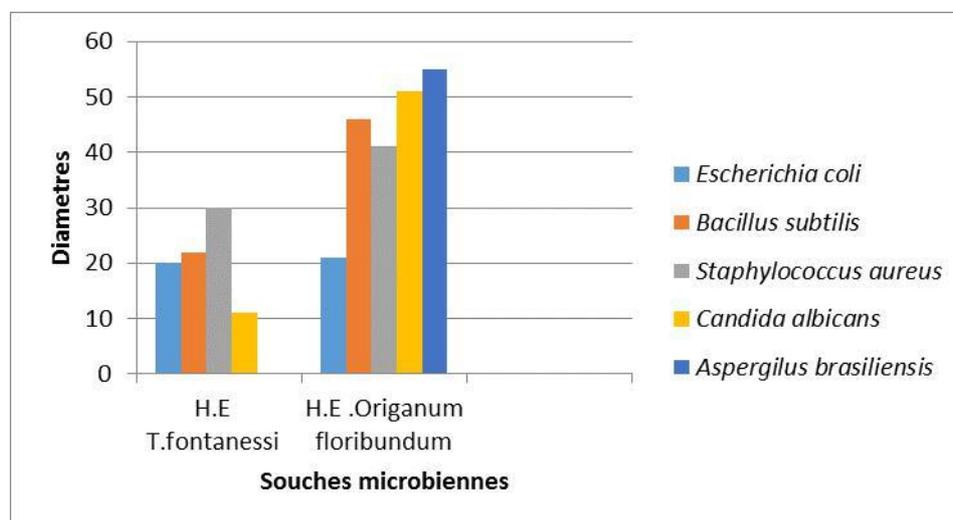


Figure 8 : Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles (*Thymus fontanessii* et *Origanum floribundum*)

D'après la **figure 8**, qui représente les zones d'inhibitions des différentes souches par les deux huiles essentielles (*Thymus fontanessii* et *Origanum floribundum*) ; on remarque que l'huile essentielle du thym a un effet antimicrobien plus qu'antifongique avec une absence de zone d'inhibition pour *Aspergillus brasiliensis* ; Cependant L'H.E de l'origan possède une activité antimicrobienne et une activité antifongique très importante.

Selon l'échelle de mesure de l'activité antimicrobienne, l'H.E (*Thymus fontanessii*) possède une action inhibitrice très importante de la croissance de *Bacillus subtilis* avec un diamètre de 22 mm et une action inhibitrice importante pour *Staphylococcus aureus* et *E.coli* avec des zones d'inhibition respectivement de 30 et 20 mm (**figure 9**).

Pour les deux autres germes *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* (levure et moisissure), l'huile a une action inhibitrice intermédiaire pour *Candida albicans*, avec une zone d'inhibition de 10 mm (**figure 9**), et aucune action inhibitrice pour *Aspergillus brasiliensis*.

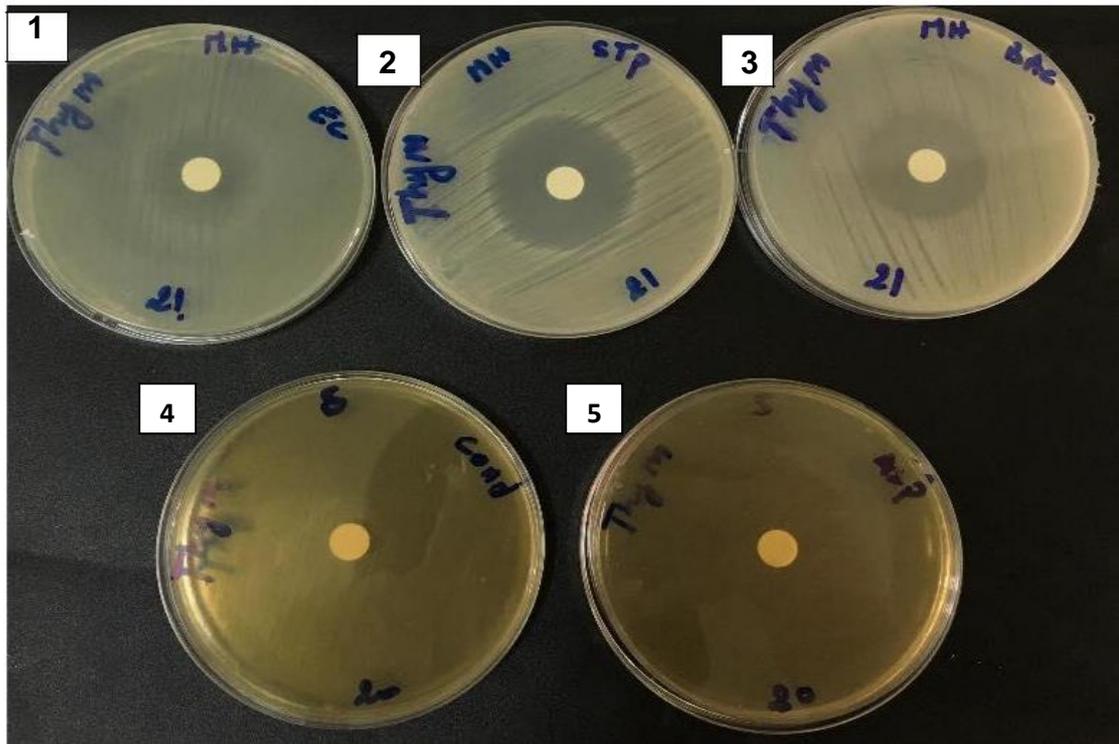


Figure 9 : Zones d'inhibition de l'HE du thym (*Thymus fontanessii*) vis-à-vis des souches.

1 : Thym. *Escherichia coli* ; 2 : Thym. *Staphylococcus aureus*.; 3 : Thym. *Bacillus subtilis* ;
4 : Thym. *Condidat albicans*; 5 : Thym. *Aspergillus brasiliensis*

Selon l'échelle cité par **Sadou et al.,(2015)**,l'HE de l'origan a une action inhibitrice importante sur les deux bactéries Gram+ (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) avec des zones d'inhibition de 46 et 41 mm respectivement (**figure 10**).

L'Origan a une action modérément inhibitrice sur la souche Gram- étudiée (*E.coli*) avec un diamètre d'inhibition de 21 mm (**figure 10**).

En ce qui concerne *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* (levure et moisissure), l'HE de l'Origan a une action inhibitrice importante sur les deux germes avec des diamètres de 51 et 55 mm (**figure 10**).

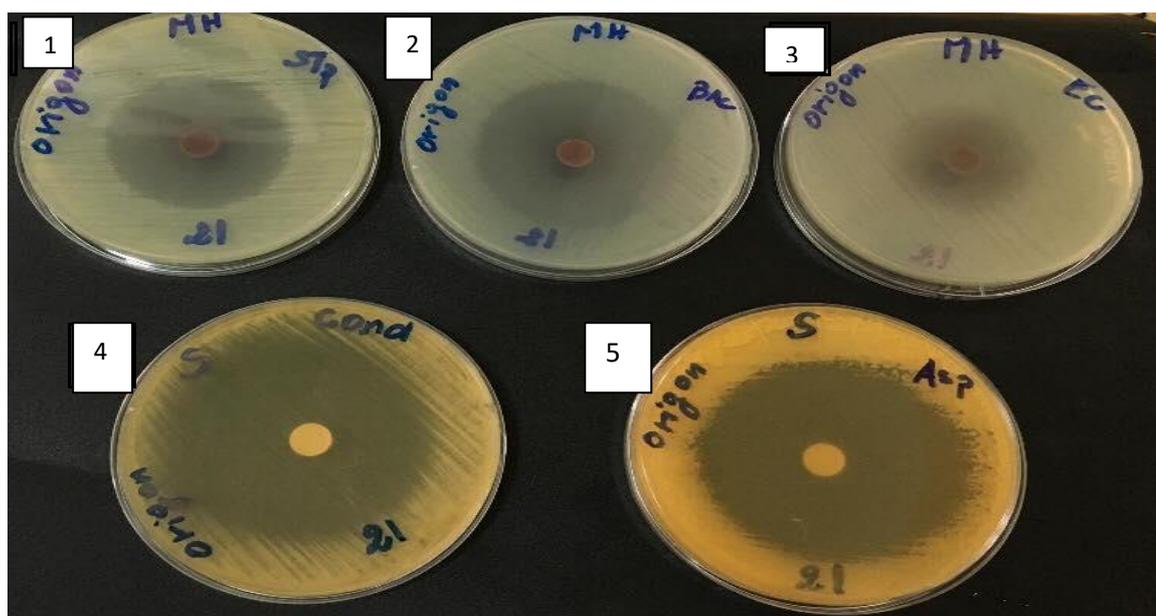


Figure 10 : Zones d’inhibition de l’HE de l’origan (*Origanum floribundum*) vis-à-vis des souches.

1: Origan *Staphylococcus aureus* ; 2 : Origan *Bacillus subtilis* ; 3: Origan. *Escherichia coli* ; 4 : Origan. *Candidat albicans*; 5 :Origan. *Aspergillus brasiliensis*

I.3 Résultats du test d’antibiogramme

Les résultats du test de vérification des antibiotiques (Primazol et Lamidaz) sont exprimés dans les **tableaux 1** et **2 (Annexe IV)** et illustrés dans la **figure** ci-dessus :

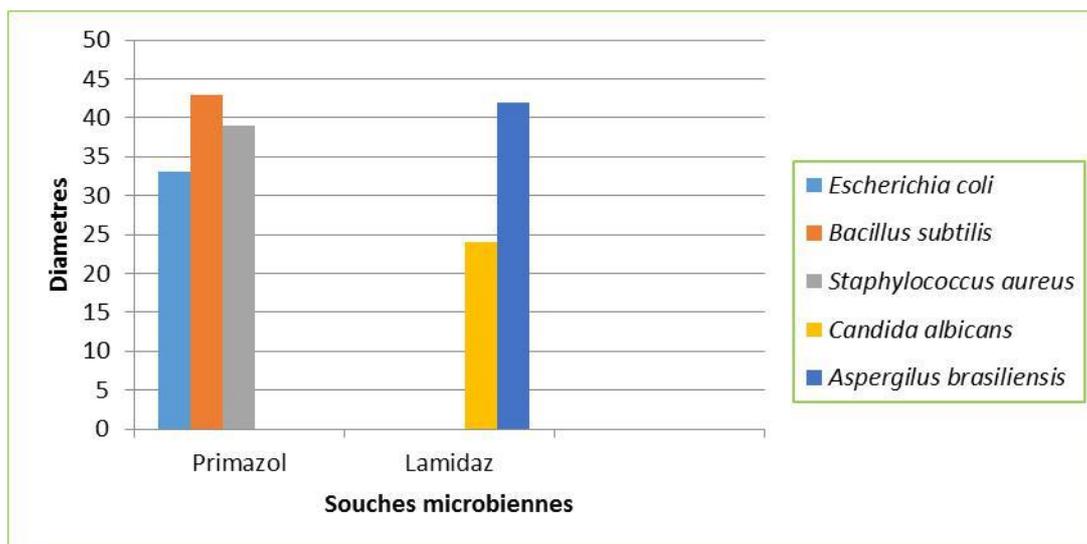


Figure 11 : Diamètres des zones d’inhibition des antibiotiques

D'après nos résultats, le Primazol et Lamidaz inhibent la croissance microbienne des cinq souches de référence citées, avec une action inhibitrice très efficace ($ZI \geq 25$ mm) pour *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Aspergillus brasiliensis* avec des diamètres de 33, 43, 39 et 42 mm respectivement (**figure 11**), et une action efficace pour *Condidat albicans* avec un diamètre de 24 mm (**figure 11**), ce qui signifie que nos produits ont une activité antimicrobienne peut être significatif.

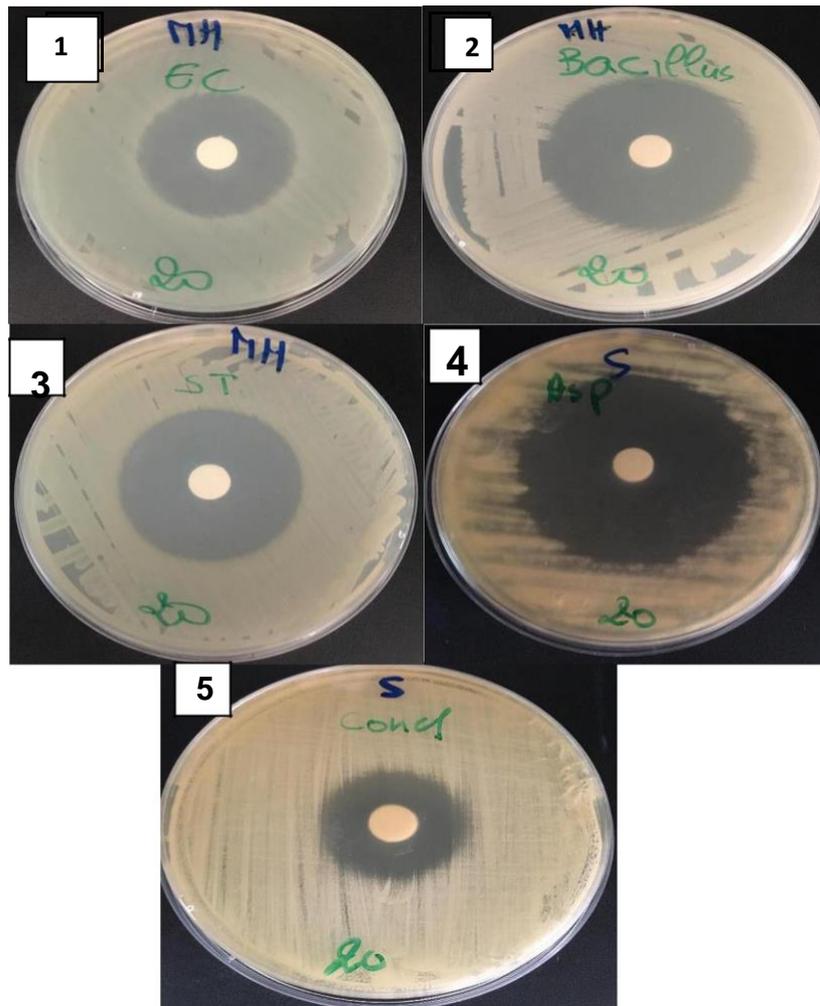


Figure 12 : Effet des antibiotiques vis-à-vis les souches.

1 :Primazol. *Escherichia coli* ; **2** :Primazol.*Bacillus subtilis* ; **3** :Primazol.*Staphylococcus aureus* ;

4 :Amidaz. *Aspergillus brasiliensis* ; **5** :Amidaz.*Condidat albicans*

I.4 Etude de l'association H.E de *T.fontanesii* / antibiotique

L'association de HE aux différents antibiotiques présentent des effets avec des diamètres des zones d'inhibition de HE, des antibiotiques et de leurs associations sont indiqués dans la figure ci- dessous :

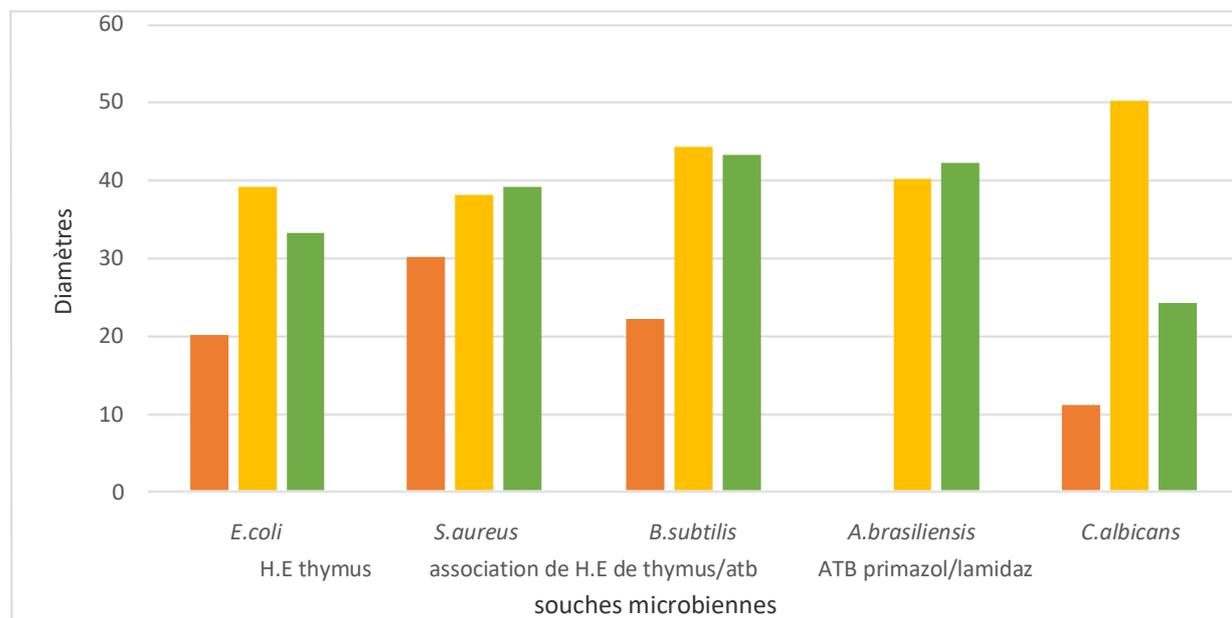


Figure 13 : Diamètres des zones d'inhibition de l'H.E de *T. fontanesii*, des antibiotiques et de leur association.

D'après la **figure 13**, on note que chez *Escherichia coli*. l'antibiotique primazol présente une activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 33mm (**figure 12**), par rapport à l'H.E de *T. fontanesii* qui est moins efficace avec un diamètre de zone d'inhibition de 20 mm (**figure 9**) , par contre on remarque que l'association entre l'H.E *T. fontanesii* et l'antibiotique présente la meilleur activité inhibitrice et a donnée des interactions synergiques avec un diamètre de la zone d'inhibition de 39 mm (**figure 14**).

Chez *staphylococcus aureus*, on note que l'antibiotique primazol présente une activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 39 mm (**figure 12**), par rapport à l'H.E de *T. fontanesii* qui est moins efficace avec un diamètre de zone d'inhibition de de 30 mm (**figure 9**), par contre on remarque que l'association de l'H.E de *T. fontanesii* avec le primazol qui présentent une activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 38 mm (**figure 14**).

Chez *Bacillus subtilis*, on note que l'antibiotique primazol présente une activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 43 mm (**figure 12**), par rapport à l'H.E de *T. fontanesii*

qui est moins efficace avec un diamètre de zone d'inhibition de 22 mm (**figure 9**), par contre on remarque que l'association de l'H.E de *T. fontanesii* avec le primazol qui présentent la meilleure activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 44 mm. (**Figure 14**).

Chez *Aspergillus brasiliensis* on note que l'antifongique lamidaz présente une activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 42 mm (**figure 12**), par rapport à l'H.E de *T. fontanesii* qui est moins efficace avec absence de diamètre de zone d'inhibition (**figure 9**), par contre on remarque que l'association entre l'H.E *T. fontanesii* et lamidaz présentent une activité inhibitrice avec des diamètres de zone d'inhibition 40 mm (**figure 14**).

Chez *Candida albicans* l'antifongique lamidaz présente une activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 24mm (**figure 12**), par rapport à l'H.E de *T. fontanesii* qui est moins efficace avec un diamètre de zone d'inhibition de 11 mm (**figure 9**), par contre on remarque que l'association entre l'H.E *T. fontanesii* et lamidaz présente la meilleur activité inhibitrice et a donnée des interactions synergiques avec un diamètre de la zone d'inhibition de 50 mm (**figure 14**).

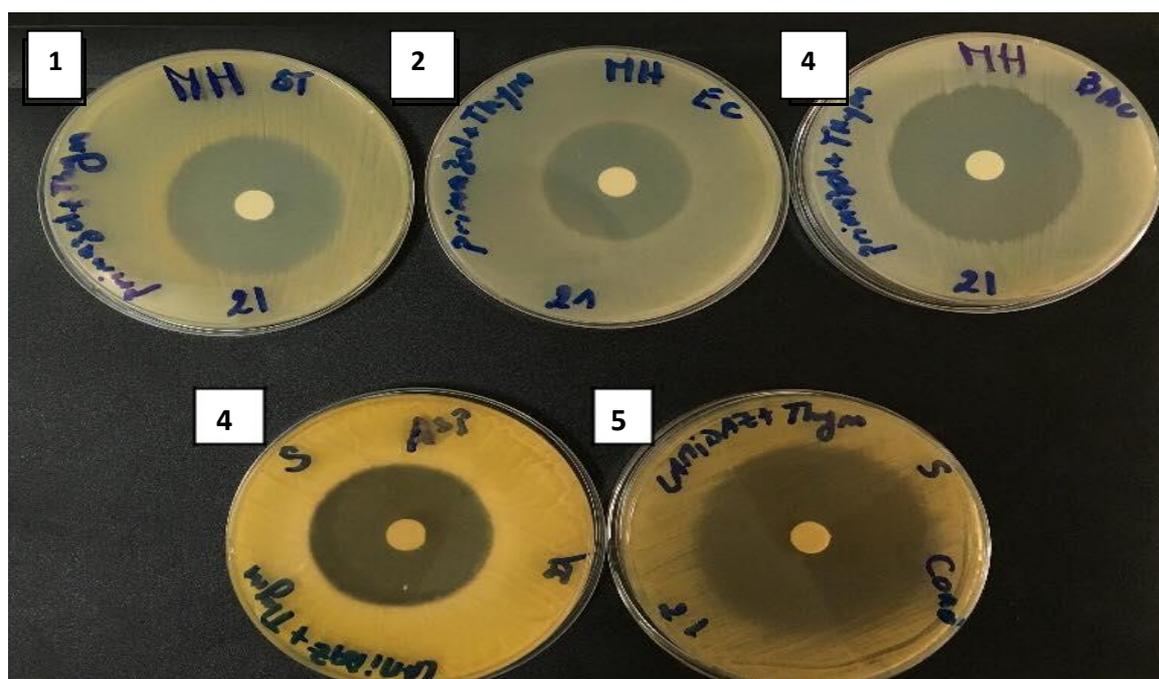


Figure 14 : Synergie de l'H.E du thym et les l'antibiotiques

- 1: Primazol+Thym. *Staphylococcus aureus*.; 2: Primazol+Thym. *Escherichia coli* ;
 3: Primazol+Thym. *Bacillus subtilis* ; 4 : Lamidaz+Thym *Aspergillus brasiliensis*;
 5 : Lamidaz+Thym. *Condidat albicans*

I.5 Etude de l'association H.E de *Origanum floribundum* / antibiotique :

L'association de l'HE aux différents antibiotiques présente des effets avec des diamètres des zones d'inhibition de l'H.E des antibiotiques et de leurs associations sont indiqués dans la **figure** ci- dessous :

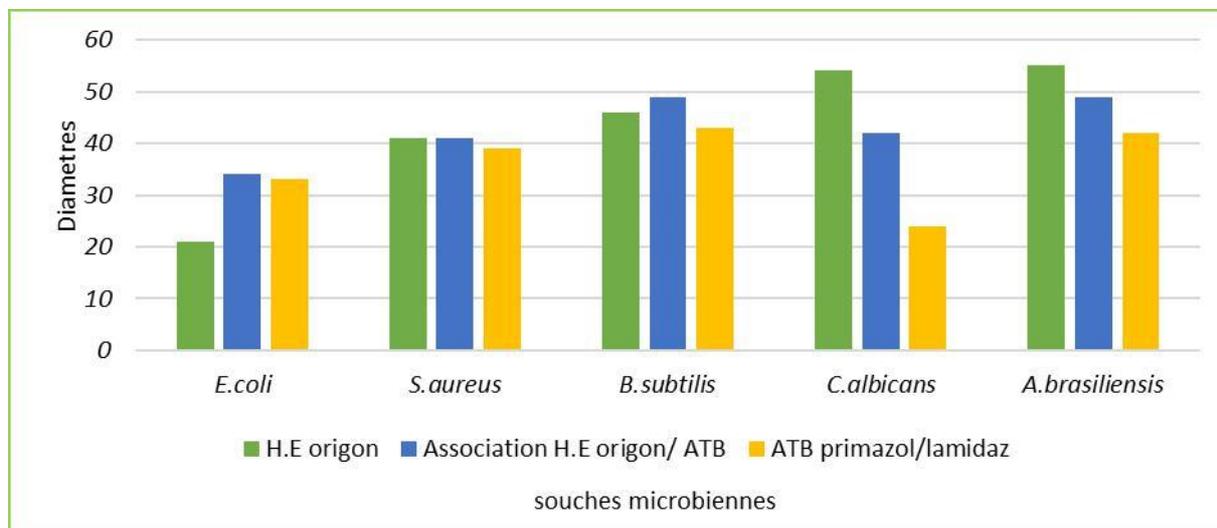


Figure 15 : Diamètres des zones d'inhibition de de l'H.E de *Origanum floribundum* de l'association HE organ/atb et des l'antibiotiques.

D'après la **figure 15**, on note que Chez *Esherichia coli*, l'antibiotique primazol présente une activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 33mm (**figure 12**), par rapport à l'H.E d'*Origanum floribundum* qui est moins efficace avec un diamètre de zone d'inhibition de 21 mm (**figure10**), par contre on remarque que l'association entre l'H.E d'*Origanum floribundum* et l'antibiotique présentent la meilleur activité inhibitrice et a donnée des interactions synergiques avec un diamètre de la zone d'inhibition de 34 mm (**figure 16**).

Chez *staphylococcus aureus* l'antibiotique primazol présente une activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 39 mm (**figure 12**), qui est moins efficace par rapport à l'H.E d'*Origanum floribundum* utilisé seul avec un diamètre de zone d'inhibition 41 mm (**figure 10**), par contre on remarque que l'association entre l'H.E d'*Origanum floribundum* et l'antibiotique présentent la même activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 41 mm (**figure 16**).

Chez *Bacillus subtilis* l'antibiotique primazol présente une activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 43 mm (**figure 12**), qui est moins efficace par rapport à l'H.E d'*Origanum floribundum* utilisé seul avec un diamètre de zone d'inhibition de 46 mm (**figure 10**), par contre on remarque que et l'association de l'H.E d'*Origanum floribundum* avec le

primazol qui présentent la meilleure activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 49 mm (**figure 16**).

Chez *Candida albicans*, l'antifongique lamidaz présente une activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 24 mm (**figure 12**), qui est moins efficace par rapport à l'H.E d'*Origanum floribundum* utilisé seul avec un diamètre de zone d'inhibition de 54 mm (**figure 10**), par contre on remarque que l'association entre l'H.E de *Origanum floribundum* et lamidaz présentent des interactions antagonistes avec des diamètres de zone d'inhibitions de 42 mm (**figure 16**).

Chez *Aspergillus brasiliensis* l'antifongique Lamidaz présente une activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 42mm (**Figure 12**), qui est moins efficace par rapport à l'H.E d'*Origanum floribundum* utilisé seul qui présente la meilleure activité inhibitrice avec un diamètre de zone d'inhibition de 55 mm (**Figure 10**), l'association entre l'H.E de *Origanum floribundum* et lamidaz indique des interactions antagonistes avec des diamètres de zone d'inhibition de 49 mm (**Figure 16**).

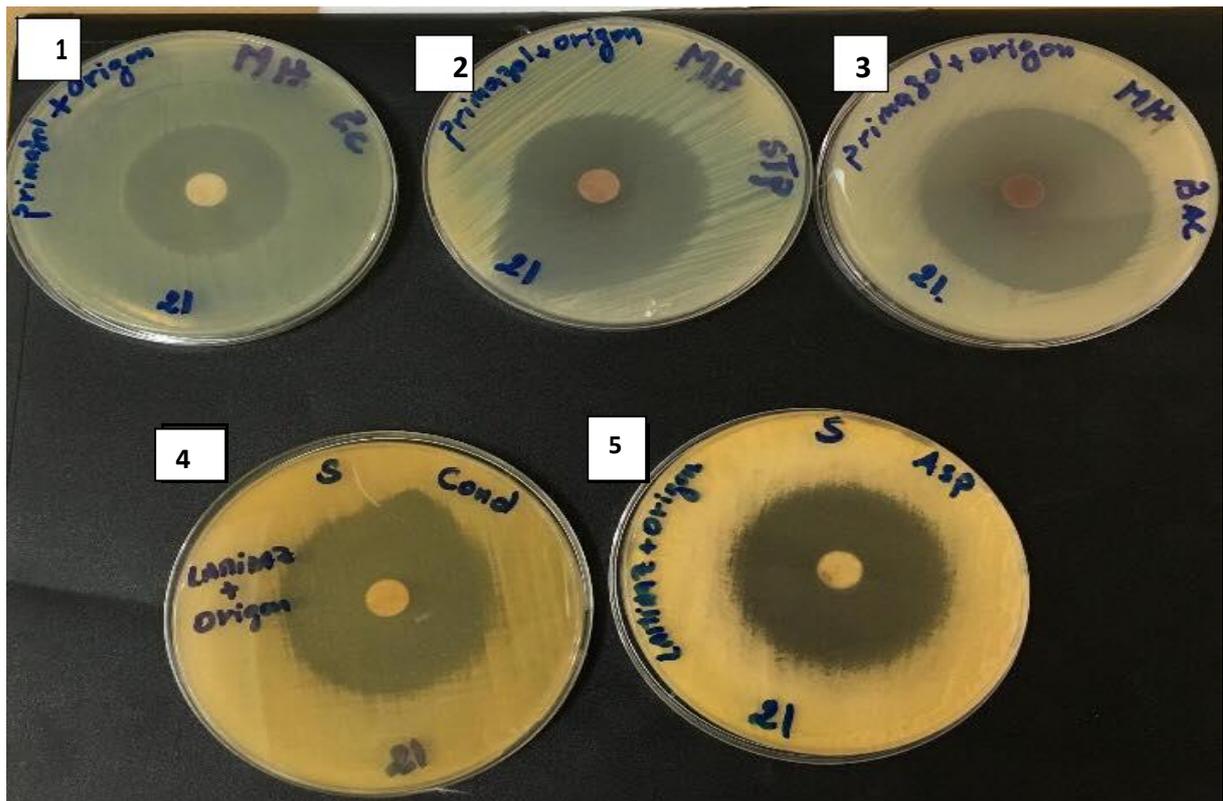


Figure16 : Synergie de l'H.E de l'origan et les antibiotiques

.1 :Primazol+Origan. *Escherichia coli*; 2: Primazol+Origan. *Staphylococcus aureus* ;3 : Primazol+Origan. *Bacillus subtilis* ; 4:Lamidaz+Origan. *Condidatalbicans*. ; 5 : Lamidaz+Origan *Aspergillus brasiliensis*.

I.6 Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne

I.6.1 Cas de *thymus fontanesii*

Les résultats de l'évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne d'huile essentielle de *thymus fontanesii* sont indiqués dans le tableau ci-dessous

Tableau 7 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'H.E *thymus fontanesii*

Souches	CMI en %
<i>Esherishia coli</i>	0.25 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.06 %
<i>Bacillus subtilis</i>	0.125 %
<i>Candida albicans</i>	0.25 %
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0.25 %

D'après le **tableau 7**, l'huile essentielle de *Thyumus fontanesii* a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries (*E. coli*, *S. aureus* et *B.subtilis*), la levure (*C. albicans*) et la moisissure (*A.brasiliensis*) testées.

S.aureus était plus sensible, il a été inhibé à la concentration minimale de 0.06 % (v/v). La concentration 0.125 % (v/v) a été suffisante pour stoppé la croissance de *B.subtilis*, tandis que *E. coli* a été inhibé à la concentration minimale de 0.25% (v/v). *C.albicans* et *A.brasiliensis* ont une sensibilité de 0.25 % (v/v). Toutes les souches bactériennes levure et moisissure ont été inhibées entre 0.06% et 0.25 % (v/v).

I.6.2 Cas d'*Origanum floribundum*

Les résultats de l'évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Origanum floribundum* sont indiqués dans le ci-dessus

Tableau 8 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'H.E *Origanum floribundum*

Souche	CMI en %
<i>Esherishia coli</i>	0.25 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25%
<i>Bacillus subtilis</i>	0.25%
<i>Candida albicans</i>	0.25%
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0.25%

D'après le **tableau 8**, l'huile essentielle d'*Origanum floribundum* a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries (*E. coli*, *S. aureus* et *B.subtilis*), de la levure (*C.*

albicans) et la moisissure (*A.brasiliensis*) testées. *S.aureus*, *B.subtilis* et *E.coli* ont été inhibés à la concentration minimale de 0.25% (v/v). *C.albicans* et *A.brasiliensis* ont une sensibilité de 0.25 % (v/v). Toutes les souches bactériennes levure et moisissure ont été inhibées à 0.25 % (v/v).

II. Discussion

Notre étude a mis en évidence une série de travaux de recherche évaluant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du thym et d'origan sur trois bactéries (*E. coli*, *S. aureus* et *B.subtilis*), une levure (*C. albicans*) et une moisissure (*A.brasiliensis*). Ces études *in vitro* ont démontré une excellente activité antibactérienne et antifongique de nos deux extraits y compris l'origan et thym analysés.

Les plantes étudiées *Thymus fontanessii* et *Origanum floribundum* ont des rendements différents. Ces différences peuvent être influencées par de nombreux facteurs, les caractéristiques physiques, la composition chimique des huiles essentielles (**Giordani et al., 2008**), l'espèce, les conditions environnementales, le séchage, la période de cueillette, le milieu de récolte, les pratiques culturales, l'âge du matériel végétale et la technique d'extraction (**Bousbia, Chikhoun, 2004 ;Garnero, 1975**). Ces caractères peuvent expliquer la différence des rendements, le *Thymus fontanessii* étudiée qui présente un rendement (2 %) supérieur au rendement chez *Thymus vulgaris* de la région d'Ifran (0,5%) du Maroc (**El Ouali Llalami et al., 2013**).

Nos deux extraits origan et thym appartenant à la famille des « Lamiacées » étudiées, ont montré une excellente activité antibactérienne et antifongique. La nature de l'activité des huiles essentielles des espèces *Thymus*, *Origanum* peut être attribuée aux composés majoritaires. Le *Thymus fontanessii* est caractérisé par sa composition majeure en γ -terpénène, thymol et p-cymène (**El Ouali lalami et al., 2013**),

Par ailleurs, **Dorman et Dreans (2000)**, ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne contre 25 genres de bactéries testées. Aussi, des études réalisées par l'organisation mondiale de la santé (**OMS, 1999**), ont également montré que ce constituant possède une forte activité antifongique et antibactérienne contre de nombreuses espèces y compris les bactéries étudiées.

Lambert et al., (2001) et Juven et al., (1994), ont expliqué le fait que le thymol se lie aux protéines membranaires et fait augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire bactérienne. D'autres études ont suggéré aussi que ce composé volatil est responsable de l'inactivation d'enzymes, y compris ceux impliqués dans la production d'énergies et la synthèse des constituants de structure (**Trombetta, 2005**). De nombreux facteurs écologiques tels que la température, l'humidité relative, l'insolation et la nature du sol peuvent influencer la composition chimique des huiles essentielles (**Oliveira et al., 2005**).

La période de la récolte des plantes peut avoir un effet sur l'activité antimicrobienne. Dans l'étude approfondie de **Bounatirou et al., (2007)** sur l'effet inhibiteur des huiles essentielles du *Thymus* durant la période de la floraison, la plante exerce un effet inhibiteur plus important.

L'activité antimicrobienne peut être influencée également par les familles des plantes. Selon **Hussain et al., (2009)** la période de la récolte et la région ont un effet sur la famille des Lamiacées tel que l'*origan* et *Thymus*.

D'autre part, nos extraits origan et thym ont montré une bonne activité sur l'ensemble des bactéries testées une action sur les gram + avec un diamètre de la zone d'inhibition varie entre 22 mm et 46 mm et sur les gram – qui varie entre 20mm et 21 mm analogue à celui de l'antibiotique de référence Primazol (diamètre allant de 33 mm pour gram- et de 39mm à 43 mm pour les gram+. **Deans et al., (1995)**, apportent que la susceptibilité des bactéries Gram+ positives et Gram- négatives vis-à-vis des huiles essentielles a une légère influence sur l'accroissement du degré d'inhibition. Cependant, il apparaît que beaucoup d'huile volatiles exercent une activité importante envers les bactéries Gram positive ; Comme il est souvent apporté que les bactéries Gram négatives sont plus résistantes aux plantes à base d'huile essentielle (**Reynolds, 1996**). Cependant l'origan est plus actif sur les bactéries et les champignons alors que le thym a montré une faible activité sur les bactéries et aucune activité sur les champignons.

Par ailleurs, le synergisme entre les huiles essentielles et les antibiotiques a été rapporté dans plusieurs études. C'est une interaction positive créée quand l'association des deux agents, provoquent un effet inhibiteur supérieur à la somme de leurs effets individuels. En effet les huiles essentielles peuvent sensibiliser le microbe pathogène à un antibiotique précédemment inefficace (**Aiyegoro et Okoh, 2009**).

L'association des huiles essentielles aux antibiotiques peut être employée pour augmenter le spectre antimicrobien (**Fadli et al., 2012**), empêcher l'apparition des mutants résistants, réduire au minimum la toxicité et minimiser les effets secondaires de l'antibiotique (**Lv et al., 2011**), ce qui pourrait être une alternative à la monothérapie pour des patients présentant des infections envahissantes difficile à traiter, comme ceux dues aux espèces multi résistantes (**Aiyegoro et Okoh, 2009**).

Dans notre étude La synergie thym s'est montrée plus efficace qu'à la synergie de l'origan sur les levures et moisissures. Il est affirmé que la forte activité antifongique observée chez l'huile essentielle de notre espèce de thym peut être attribuée seulement au thymol et au carvacrol (**Faleiro et al ; 2003**), comme elle peut être le résultat de synergies entre les différents constituants de cette huile.

Il a été démontré que certains composés de plantes peuvent inhiber efficacement les pompes à efflux impliqués dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques. Cela pourrait conduire à la restauration de la sensibilité aux antibiotiques et de réduire leurs doses (**Fadli et al., 2012**).

L'évaluation quantitative de l'activité d'HE de *T. fontanesii* et *O.floribundum* par la méthode de diffusion en milieu solide, a révélé l'inhibition de croissance des colonies des souches bactériennes et levuriformes et les moisissures. Cette activité montre un profil variable sur toutes les souches utilisées, ce qui se traduit par des concentrations d'inhibition différentes et donc une différence de sensibilité de ces souches vis-à-vis ces huiles essentielles.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la plus faible concentration d'HE à laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil (**Gachkar et al., (2007)**). Toutes les souches se sont inhibées à une concentration comprise entre 0.06% et 0.25% (v/v). Les levures et les moisissures sont également sensibles aux l'HEs mais avec des CMI plus importantes atteignant 0.25% (v/v) pour *Candida et Aspergillus*.

Donc, dans cette étude, il est constaté une sensibilité différente selon la nature des souches étudiées. Cette différence ne peut être expliquée que par la diversité structurale de la paroi de ces différentes catégories de bactéries. Ces résultats sont en accord avec ceux du screening publiés par **Pinto et al., (2006)** ainsi que ceux de **Maksimovic et al., (2008)**, pour d'autres variétés de thym et d'origan.

Enfin, notre étude systémique comprend certaines limites. La comparaison entre ces deux huiles essentiels thym et origan testées sur les bactéries (*E. coli*, *S. aureus* et *B.subtilis*) levure (*C. albicans*) et une moisissure (*A.brasiliensis*) a permis d'envisager et exploiter l'H.E d' origan comme antibiotique naturel pour le traitement de plusieurs maladies infectieuses causées par les agents pathogènes bactériens. Alors que la synergie thym est plutôt exploitée pour un antifongique naturel pour le traitement des infections dues à plusieurs agents fongiques.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antimicrobienne des (*Thymus fontanesii* et *Origanum floribundum*), vis-à-vis de cinq souches (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*). L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation de type Clevenger a été réalisée pour les plantes étudiées, les rendements des huiles essentielles : Thymus, origan sont différents et sont de l'ordre de 2% et 4.3 % respectivement, d'où on constate que le l'origan présente le meilleure rendement.

Dans notre étude, l'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée par la méthode d'aromatogramme. l'efficacité de nos extraits origan et thym vis à vie des germes testés aussi bien bactéries gram + et gram - que levures et moisissures *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*, peuvent impacter et trouver scientifiquement une application de ces deux herbes (origan et thym), dans la prévention et le traitement pour des infections bactériennes et fongique dues à plusieurs agents pathogènes bactériens et fongiques comme *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* qui développent une résistance contre les antibiotiques de synthèse. L'incorporation de la synergie origan comme antibactérien et synergie thym comme antifongique est recommandée.

Les résultats de cette étude montrent que les deux herbes origan et thym peuvent être de bons candidats pour explorer de nouveaux agents antibactérien et antifongique pour combattre les infections d'origine bactérienne ou fongique.

Références Bibliographiques

A

- ✓ **Alaoui-Jamali C., Kasrati A., Leach D., Abbad A. (2016).** Etude comparative de l'activité insecticide des huiles essentielles des espèces de Thyms originaires du sudouest marocain. *Phytothérapie*. 1-7.
- ✓ **Anton R. and Lobstein A., (2005).** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc., Paris, 522p.
- ✓ **Amlan KP. (2011).** Effets of Essentiel oils on Rumen Fermentation, Microbial Ecology and Ruminant Production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. **6 (5)**, 416-428.
- ✓ **Aiyegoro OA et Okoh AI. (2009).** Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: Implications in antimicrobial chemotherapy. *Journal of Medicinal Plants Research*. **3(13)**, 1147-1152.
- ✓ **Azzoudj S., 1999.** Valorisation des huiles essentielles de quelques espèces d'Origanum et thymus spontanées en Algérie. Thèse Ing., Institut d'Agronomie, Blida.

B

- ✓ **Barati S., Baigi G., Beigi S., Dehghani M. (2013).** The effects of Thymus daenensis extract on maintenance and growth of yogurt starter bacteria. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. **4 (2)**: 468-471.
- ✓ **Bekkalif F., Averbek S., Averbek D., Idaomar M., (2008).** Biological effects of essential oils. *Food and chemical Toxicology*, **46** : 446-475.
- ✓ **Boukhebti H, Chaker AN, Belhadj H, Sahli F, Ramdhani M, Laouer H et Harzallah D. (2011).** Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*. **3 (4)**, 267-275.
- ✓ **Bruneton J., (1993).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2ème Ed. Lavoisier, 385-623.
- ✓ **Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier, 3ème Edi, Paris. 585 P.
- ✓ **Baser K.H.C., Ozek T., Kurkcuoglu M. and Tumen G., 1992.** Composition of the essential oil of *Origanum sipyleum* of Turkish origin. *Journal of Essential Oil Research*, **4**, 139-142.
- ✓ **Brunetons J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier, *Tech. et doc.*, 3^{ème} Ed., Paris.
- ✓ **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2^{ème} Ed.

- ✓ **Bolla JM, Alibert-Franco S, Handzlik J, Chevalier J, Mahamoud A, Boyer G, Kiec-Kononowicz K et Pages JM . (2011).** Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. **585**, 1682-1690.

C

- ✓ **Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L et Ferret A. (2007).** Invited Review : Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. **90**, 2580-259.
- ✓ **Couic-Marinier F et Lobstein A. (2013).** Composition chimique des huiles essentielles. *Actualites pharmaceutiques*. N° 525. 1 p.
- ✓ **Chiej R. (1982) :** les plantes médicinales .Ed .Solar,
- ✓ **Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017).** Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, *4*(3), 58.
- ✓ **Carmo M.M., Frazao S. and Venancio F., 1989.** The chemical composition of Portuguese *Origanum vulgare* oils. *Journal of Essential Oil Research*, **1**, 69-71.
- ✓ **Canu A et Peter F, 2001.** Le préparateur en pharmacie Edition Tec et Doc, Paris, p 51-58.
- ✓ **Clive P, Morley C et Brian B, 1999.** Pharmacologie intégrée en 1ère édition debook université, p 233.
- ✓ **Chikhoun A., 2004.** Huiles essentielles d'espèces endémiques algérienne : composition chimique et l'activité antioxydante vis a vis de l'huile de tournesol. Mémoire Ingénieur, INA, Alger, 118.
- ✓ **Chang S. T., Chen P. F. and Chang S. C., 2001.** Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, **77**, 123–127.

D

- ✓ **Dauqan E.M.A., Abdullah A. (2017).** Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* Vol. 5 (02): 017-022.
- ✓ **Dob T., Darhamane D., Benabdelkader T., Chelghoum T.C., (2006).** *Int.j.Aromatherapy*, **16** : 95-100.
- ✓ **Djilani A et Dicko A.(2012).** The Therapeutic Benefits of Essential Oils. *Nutrition, Well Being and Health*, Dr. Jaouad Bouayed (Ed.), ISBN: 978-953-51-0125-3, In

Tech, Available from:[http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/ the therapeutic benefits-of-essential-oils](http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/the_therapeutic_benefits-of-essential-oils).

- ✓ **Donelian .A ,L .H. C. Carlson, T.J.Lopes,R.A .F.Machado. (2009).** « comparison of extraction of patchouli (*pagostemon cablin*) essential oil with supercritical co2 and by steam distillation », the journal of supercritical fluids , 48,15-20.
- ✓ **De Billerbeck G., 2000.** Activité fongique de l'huile essentielle de *cymbopogon nardus* sur l'*Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur." *Faculté des sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse, 236.*
- ✓ **Dorman H.J.D.et Deans H.J.D.(2000)** .Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. –J. Appl. Microbiol. 88, 308-316.
- ✓ **Deans S G., Noble R C., Hiltunen R., Wuryani W et Penzes LG., 1995.** Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L) Merr perry : impact upon bacteria, fungi and fatty acid level in ageing mice. *Flavour Frag J 10: 323-328*

E

- ✓ **El Ouali Lalami , Fouad, Wissal. (2013).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain: *Thymus vulagris* et *Thymus satureioïdis*. *Thymus vulagris, 27-33.*

F

- ✓ **Fauchère J.L. et Avril J.-L., (2002).** Bactériologie générale et médicale: Ellipses Editions Paris, 365.
- ✓ **Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui N, Pages J.M et Hassani L. (2012).** Antibacterial Activity of *Thymus Maroccanus* and *Thymus Broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine. 19, 464–471.*
- ✓ **Festy D. (2011).** Les huiles essentielles ca marche. A propos de l'aromatherapie. Editions: Leduc.s .Paris. 9 p.
- ✓ **Faleiro M.L, Miguel M.G, et al. -** Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*- *Lett Appl Microbiol; Vol. 36; N°1; pp 35-40. 2003*
- ✓ **Fadli S., Kessi A., 2005.** Composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles du thym et de l'origan :*Thymusnumidicus* Poiret et *origanum floribundum* Munby. *Memoire Ingénieur, INA, Alger, 92.*

G

- ✓ **Ghannadi A., Sajjadi S.F., Kabouche A., Kabouche z, (2004).** Thymus fontanessii Boiss et Reut .A potential source of thymol-rich essential oil in North Africa. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. 59 : 187-189.
- ✓ **Ghelichnia H. (2016).** Essential oil composition of three species of thymus growing wild in mazandaran, Iran. Cercetari Agronomice in Moldova. 49 (2): 107-113.
- ✓ **Goetz P et Ghedira K. (2012).** Phytotherapie anti-infectieuse. Edition : Springer-Verlag France, Paris. Pp 4-194.
- ✓ **Guenther E., (1972).** The essential oils, Vol.3, Ed. Robert Krieger publishing co, Huntingtons, New York
- ✓ **Garland S., 1980.** Le livre des herbes et des épices. Ed.Fernand Nathan, Paris, 288.
- ✓ **Guignard J.L., 1996.** Biochimie végétale. Ed. Masson, Paris.
- ✓ **Garnero M.J., 1977.**Problèmes rencontrés au cours de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles. In *Parfums cosmétiques, aromes*, **14**, 31-40.
- ✓ **Gachkar L, Yadegari D, Rezaei M.B, Taghizadeh M, Astaneh S.A, Rasooli I-** Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils- Food Chemistry; Vol. 102; pp: 898-904. 2007
- ✓ **Giordani R ., Hadeif Y.and Kaloustian J. (2008)** – Composition and antifungal activities of essential oils of some Algeria aromatic plants. Fitoterapia, 79 : 199-203.
- ✓ **Garnero J. (1975).** Quelques problèmes rencontrés au cours de l'obtention du contrôle et de l'étude de la composition des huiles essentielles. Journée dermatopharmacie(Nice), 105- 126

H

- ✓ **Haraguchi H., Saito T., Ishikawa., Date H., Kataoka S., Tamura Y., Mizutani K., 1996.** Antiperoxydative components in *Thymus vulgaris*. *Planta Medica*, **62**, 217-221.
- ✓ **Haddouchi F et Benmansour A. (2009).** Huiles essentielles, utilisation et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. Les technologies de laboratoire.N°08. 8 p.
- ✓ **Haddouchi F., Benmansour A.,(2008).** Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques Application à deux plantes aromatique. Université Tlemcen.les technologies de laboratoire-No8 janvier-février 88.

I

✓ **Inouye S., 2003.** Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). *International Journal of Aromatherapy*, 13, 95-107.

✓ **Iserin P. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales. Ed : Larousse Bourdasse. Paris. P335.

K

✓ **Kholkhal F. (2014).** Etude Photochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *eucliliatus*. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid.

L

✓ **Leyva-lopez., Vazque-olivo., Heredia jB. 2017.** *Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties.*

✓ **Lozniewski A, Rabaud C et Nancy. (2010).** *Résistance bactérienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins .CCLIN Sud-Est.*

✓ **Labiad M.H., Harhar H., Ghanimi A., Tabyaoui M. (2017).** *Phytochemical screening and antioxidant activity of Moroccan Thymus satureioïdes extracts.* Journal of Materials and Environmental Sciences. 8 (6): 2132-2139.

✓ **Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M.(1995).** Microbiologie générale : La bacterie et le monde bactérien, DOIN, Paris, 517p.

✓ **Lv F, Liang H, Yuan Q et Li C. (2011).** In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against.

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

M

✓ **Merck ad co, introduction to medical mycology 2001.**

✓ **Merghache, S., Hamza, M. & Tabti, B. (2009).** Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie. *Afrique Science*, 05(1): 67 - 81.

✓ **Mailhebiau p., (1994).** *La nouvelle aromathérapie : biochimie aromatique et influence Psychosensorielle des odeurs.* Lausanne. P : 635.

✓ **Meyers Michele, 2005.** *Oregano and Marjoram.* The herb society of America.

✓ **Morales R., (2002).** The history , botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In : *Thyme : the genus Thymus.* Ed. Taylor & Francis. London. Pp 1-43.

- ✓ **Mohammedi Z., 2006.** *Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïde de quelques plantes de la région de Tlemcen*, magistère Université Abou Bakar Bel Kaid Tlemcen, p105.
- ✓ **Mira .B, Blasco.M ,Subirats. S, (1996).** « Supercritical co2 extraction of essential oils from orange peel », the journal of supercritical fluids , ,9 , 238-243 .
- ✓ **Matyara F, Kayab A et Dinçerb Sk. (2008).** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science of the Total Environment.* 407, 279-285.
- ✓ **Maloine S-A, 1979.** VAD-MECUM des antibiotiques et agents chimio thérapeutiques anti-infectieux, 4ème Edition, Paris, P 345-355.
- ✓ **Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R. (2008).** Botanique. Biologie et physiologie végétales. Maloine (ed.). Paris. P. 467.

Maksimović Z, Milenković M, Vučićević D, Ristić M- Chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus pannonicus* All. (*Lamiaceae*) essential oil- Cent Eur; J. Biol; Vol. 3; N°2; pp 149–154. 2008

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.
- ✓ **Neter P et Rouveix B, 1989.** Médicament en pathologie infectieuse. Edition Masson, Paris, p 7-77.

O

- ✓ **Ozcan M. et Chalcha J. C., (2004).** Aroma profile of *Thymus vulgaris* L growing wild in Turkey . *Bulgarian journal of plant physiology .* 30(3-4) : 68-73.
- ✓ **Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 1999.** Monographs on selected medicinal plants. Geneva, Switzerland : OMS.
- ✓ **Oussalah (1) M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M., 2007.**Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control,* 18, 414-420.

P

- ✓ **Pirbalouti A., Bistghani Z., Malekpoor F, 2015.** An overview on genus Thymus. *J. Herb. Drugs.*;6:93–100.
- ✓ **Pibiri M.C., C. Seigniez et al ., 2001.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants. *CISBAT 2001*, Lausanne, LESO, EPFL.
- ✓ **Pibiri M.C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, Lausanne, Canada, 177.
- ✓ **Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves M.J, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A and Martinez-de-Oliveira J -** Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species- *Journal of Medical Microbiology*; Vol. 55; pp 1367–1373. 2006
- ✓ **Padulosi S., 1997.** Oregano. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, Valenzano (Bari), Italy; IPGRI: Rome, Italy.
- ✓ **Padrini F. ;Lucheroni M.T. (1996) :** le grand livre des huiles essentielles .Ed .de Vecchi,
- ✓ **Pariente L.,(2001).** Dictionnaire des sciences pharmaceutiques et biologique 2 éme ed, Académie national de pharmacie. Paris, 643 p.
- ✓ **Pharmacopée française, Xéme édition.** Edition Maisson neuve éditeur, 1986.
- ✓ **Pharmacopée française, Xéme édition.** Edition Maisson neuve éditeur, 2011 .

Q

- ✓ **Quezel P. et Santa S., 1963.** Nouvelle flore d'Algérie et de régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris.

R

- ✓ **Rameau J. C., Mansion D., Dumé G., Gauberville C. (2009).** Flore forestière française, 3 Région méditerranéenne. Institut pour le développement forestier (ed.). P. 975,1069.
- ✓ **Richard H., 1992.** Epices et aromates. Ed. Technique & Documentation - Lavoisier, Paris, 339.
- ✓ **Richard F., 1992.** Manuel des corps gras, Paris, Ed. Lavoisier, Tec. Et Doc., 1228-1242.

- ✓ **Revenchon.E, (2008).** « Supercritical fluid extraction and fabrication of essential oils and related products », the journal of supercritical fluids, 1997 ,10 ,1-37Office fédéral de la santé publique. “Les Huiles Essentielles.”. Confédération suisse.
- ✓ **Reynolds J. (1996).** The Extra Pharmacopoeia, 31st edition. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London.
- ✓ **Ruberto G., Baratta M.T., Sari M. et Kaabeche M., 2002.** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. Flavour and Fragrance Journal, 17, 251-254.

S

- ✓ **Selmi S et Sadok S., (2008).** The effect of natural antioxidant (*Thymus vulgaris* Linnaeus) on flesh quality of tuna (*Thunnus linnaeus*) during chilles storage. Pan-Américain Journal of aquatic sciences .3 (1) : 36-45.
- ✓ **Stahl-Biskup E., 1991.** The chemical composition of *Thymus* oils: A review of the literature 1960-1989. *Journal of Essential Oil Research*, 61-82.
- ✓ **Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., and Arsenakis M., 1996.** Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils. *Journal of Food Chemistry*, **44**, 1202-1205.

U

- ✓ **Ultee A., Kets E. P. W. and Smid E.J., 1999.** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4606-4610

V

- ✓ **Vale-Silva L., Silva M.J., Oliveira D. 2011.** *Correlation of the chemical composition of essential oils from Oragnum vulgare subsp. Virens with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi.* *Journal of Medical Microbiology* 61-(2012) 252-260.
- ✓ **Vokou D., Kokagkini S.and Bessiere J.M.1993.** Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochem. Systematics and Ecology*, **21**, 287-295.

X

- ✓ **Xavier. F, Chemat .F, (2012).** La chimie des huiles essentielles, Tradition et innovation.

Y

- ✓ **Yala D, Merad AS, Mohamedi D. et Ouar korich MN. (2001).** Resistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Maghreb.* **91**, 6-14.

Z

- ✓ **Zaika L.L., (1988).** Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its Determination. *Journal of Food Safety*, 9, 97-118.
- ✓ **Zlotorzynski A. (1955):** Microwaves assisted extraction of essential oils from vegetal material. *Anal . Chem* .25(1), p : 43-76,.

Annexes

Annexe I

Milieu MH (Muller-Hinton)

La **gélose Mueller-Hinton** est une gélose riche pour la réalisation d'antibiogramme standard

Composition :

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Peptone 17,50
- Extrait de viande 2,00
- Amidon 1,50
- Agar 17,00
- pH final à 25°C : $7,3 \pm 0,1$

Préparation :

- Mettre en suspension 38,0 g de milieu déshydraté (BK048) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 115°C pendant 15 minutes.

Milieu Sabouraud

La gélose Sabouraud permet la croissance et l'isolement d'une grande variété de levures et moisissures.

Composition :

- Peptone..... 10 g
- Glucose massé..... 20 g
- Agar-agar..... 15 g
- Eau distillée (qsp)..... 1 000 ml
- vitamines et facteurs de croissance
- pH = 6,0

Préparation :

- Mettre en suspension 65 grammes dans 1 litre d'eau pure.
- Porter le milieu à ébullition sous agitation constante pendant au moins 1 minute.
- Répartir en tubes ou flacons.
- Autoclaver à 115°C pendant 15 minutes.

ANNEXE II

Matériel non biologique

Appareillages	Verreries et autre	Réactifs et solution
Balance de précision, -Clevenger, -Hôte, -Plaque chauffante, -Bain marie, -Etuve d'incubation, -Bec bunsen, -Balance hydrostatique.	-Eprouvette, -Erlen Meyer, -Chauffe ballon, -Fiole, -Becher, -Boite de pétri, -Disques en papier, -Fioles jaugées, -Pipettes, -Pince de laboratoire.	-Eau distillée, -Eau de javel, -Eau physiologique, -Méthanol

Annexe III

Microorganismes testées :

Bacillus subtilis : Bacillus gram positif. Aérobiestirict, sporulé (spores non déformantes), Nitraite+, Catalase-



(Originale 20019)

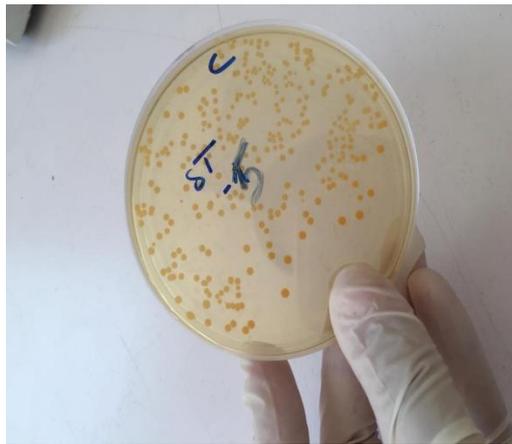
Escherichia coli : Bacterie sous forme de colibacille. Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif, mobile, asporulée, sur milieu sélectif (Gélose Mac conkey) les colonies apparaissent grandes, rouge avec un halo trouble.



(Originale 2019)

Annexe

Staphylococcus aureus : Bactérie sous forme de cocci Gram positif regroupés en amas sous forme de grappe de raisin, aérobie facultatif, immobile ; elle donne de petite colonies arrondies pigmentées après 24 à 36 h d'une coloration jaune dorée sur milieu sélectif Chapman ou noir avec un halo jaune sur Vogel-Johnson ; Manitol+ , Désoxyribonucléase+, staphylocoagulase+ .



(Originale 2019)

Candida albicans: C'est des levures blanches non encapsulées, unicellulaires se multipliant par bourgeonnement avec possibilité de croissance sous forme de pseudo mycéliums et de mycéliums ; elles donnent des colonies de forme moyenne blanche crémeuse, lisses ; Glucose+, Maltose, Galactose+. Arabinose+.Raffinose+, Inositol+



(Originale 2019)

Aspergillus brasiliensis :



(Originale2019)

Annexe IV

Tableau 1: Résultats du test de l'efficacité du Primazolet Lamidazur des souches de référence :

Souches	Normes du primazol	Résultats
<i>Escherichia coli</i>	≤ 26 mm	33 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤ 29 mm	39 mm
<i>Bacillus subtilis</i>	≤ 28 mm	43 mm

Tableau2 : Résultats du test de l'efficacité du Lamidazur des souches de référence :

Souches	Normes de Lamidaz	Resultats
<i>Candida albicans</i>	≤24 mm	24 mm
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	≤29 mm	42 mm

Annexe V

Tableau : Techniques d'extraction des huiles essentielles

Technique d'extraction	Principe	Avantages	Inconvénients
Distillation par entraînement à la vapeur d'eau	Faire passer à travers la matière végétale un courant de vapeur d'eau, ces vapeurs saturées en composés organiques volatils sont condensées et récupérées par décantation. Les phénomènes intervenants lors de l'entraînement à la vapeur seraient l'osmose et la diffusion libre (Guenther, 1972).	Absence de phénomène d'hydrolyse ou de dégradation des molécules aromatiques. - Meilleure récupération des HE entraînées. (Xavier et Chemat, 2012).	Elle exige de la haute température. (Xavier et Chemat, 2012).
Hydrodistillation	L'extraction s'effectue dans un appareil de type Clevenger. Le végétal est immergé dans l'eau portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et HE se sépare par différence de densité (Bruneton, 1993).	Très largement utilisée en parfumerie et cosmétologie. - Utilise des T°C modérées. -La consommation énergétique est réduite. (Xavier et Chemat, 2012).	L'extraction peut atteindre plusieurs heures. (Xavier et Chemat, 2012).
Enfleurage et Macération	-Les fleurs sont mises à macérer dans des graisses et chauffées après étalées sur des châssis en bois pendant plusieurs jours. Une fois gorgés de parfum. - Les corps gras sont filtrés au travers de tissus de lin ou de coton, Les huiles sont ensuite lavées à l'alcool pur, filtrées et évaporées (Bruneton, 1993).	-Très utilisée pour les fleurs extrêmement délicates (le jasmin, la tubéreuse, et les fleurs d'oranger). (Padrini et Lucheroni, 1996).	-Très coûteuse - Durée d'extraction est très longue -Le rendement en HE est faible. (Xavier et Chemat, 2012).
Extraction par solvant organique	- Les fleurs sont mises dans un récipient avec le solvant (l'hexane).La solution sera distillée ensuite traitée avec l'alcool pur pour éliminer les impuretés. - Une seconde distillation est faite pour obtenir une essence dite absolue (Chiej, 1982).	-Utilise des températures très faibles. - Le rendement est supérieur. -Utilise surtout pour les plantes fragiles (Henri, 1993).	-Manque de sélectivité - Toxicité de solvant - Résidus de solvant peuvent être présentés dans l'HE (Bruneton, 1999).

Annexe

Extraction assistée par micro-ondes	- La plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-onde dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. - L'HE est entraîné dans le mélange isotopique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée. (Bruneton, 1999).	Très rapide et peu consommateur d'énergie. - Un rendement en HE est élevé (Zlotorynski, 1995).	
Extraction par CO2 Supercritique	-Le végétal est placé dans un extracteur traversé par le flux de CO2 supercritique. - Le fluide se charge en composés extraits, puis il est détendu, passe en phase gazeuse et se sépare du composé extrait. ce dernier est recueilli dans un séparateur (Reverchon, 1997).	-CO2 abondant. -Peu coûteux, non toxique - Diffusion élevée - Extraction sélective et douce sans dénaturer les molécules sensibles (Mira et al., 1996).	-Investissement pour matériel coûteux -Consommation d'énergie importante (Donelian et al., 2009).