



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Kasdi Merbah OUARGLA

Faculté des sciences appliquées

Mémoire de fin d'étude

Master académique

Domaine : Sciences et Technologies

Filière : Génie des procédés

Spécialité : Génie chimique

Thème :

Etude de la composition chimique et les activités
biologiques des huiles essentielles de *Thymus Capitatus*

Présenté par :

Bazzine Oum Kalthoum

Benzaid Zahret El Oula

Soutenue publiquement le : 06 juillet 2019 devant le jury

Mr. BEBBA. A EL HAFID

MCA

President

UKM Ouargla

M^{elle}. ZIGHMI SOUAAD

MCB

Examineur

UKM Ouargla

Mr. GOUDJIL M^{ed} Bilal

MCB

Encadreur

UKMOuargla

Année universitaire :2018/2019

Dédicace

Je dédie ce modeste travail, à mes très chers parents que m'ont
soutenu tout au long des mes étude

A mes chères frères ,sœur, Amis

A toute ma famille.

A mes enseignants et professeurs du primaire à l'université

A mon binôme (zahret eloula)

Tous mes chères amies (Elkhanssa et Fardous)

Oum Kalthoum

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à

Ma mère et mon père qui me sont les plus chères, Je souhaite que dieu les garde en bonne et parfaite santé et leur donne une longue vie.

A Mes sœurs et mes frères de grands à petits

A Ma petite belle Zahra

A Mes cousins et mes cousines

A Toute la famille BENZAGH

A mon binôme Oum kalthoum

A mes amis en particulier : Elkhansae et Ferdousse

A mes enseignants et professeurs du primaire à l'université

A tous personnes que n'aurions nommées ici et tous que connue moi.

ZAHRET EL OULA

Remerciement

"الحمد لله الذي هدانا لهذا وما كنا لنهتدي لولا ان هدانا الله"

Avant tout nous remercions ALLAH tout puissant de nous avoir accordé la santé, la force, le courage et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Mes plus vifs remerciements au professeur Mr GOUDJIL Med BILAL, mon encadreur pour ses précieux conseils et ses encouragements comme il a été présent à tout moment qu'on a besoin de lui.

Je souhaite également remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail;

Tous les enseignants du département de génie des procédés

Je remercie tous les membres de l'équipe de laboratoire de génie des procédés pour leur accueil et leur sympathie.

J'adresse mes sincères remerciements à Dr. HANNONI qui m'en a aidé durant pour la réalisation de partie de l'activité antibactérienne, ainsi que ses idées constructives.

Pour toute la promotion de génie chimique 2018/2019.

ملخص:

يندرج هذا العمل في اطار دراسة التركيب الكيميائي والنشاط المضاد للبكتيريا والفطريات للزيوت الأساسية للنباتات العطرية والطبية الجزائرية و كانت نبتة (Thymus Capitatus) موضوع التحليل الكيميائي , بهدف للبحث عن منتجات حيوية جديدة من أصل طبيعي تتمتع بأنشطة بيولوجية بما في ذلك الأنشطة المضادة للميكروبات . تم الحصول على الزيت الاساسي بالتقطير المائي وكان مردوده يقدر ب 1.56 % , وقد أظهر تحليل الزيت أن خواصه الفيزيائية والكيميائية تتفق مع المعايير . وقد تم تحديد تركيبها الكيميائي بواسطة الكروماتوغرافي الغازي المقترن بقياس الطيف الكتلي (GC / MS) عن 22 مكوناً بما في ذلك: thymol (51.22%) , carvacrol (12.59%) و γ -Terpinene (10.3%) كمكونات ذات التمثيل الاغلب .

تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيت الاساسي بعمليات في المختبر على وسط حيوي (Mueller-Hinton) , أظهر زيت الزعرالبري نشاطاً مضاداً للبكتيريا أفضل من المضادات الحيوية التجارية (*Chloramphénicol* , *Cefoxitin* , *Gentamycine*) ضد جميع البكتيريا التي تم الدراسة عليها , قيم التركيز الادنى للزيت ضد اليكتيريا هي (7.36 و 14.72 , 14.72 , 29.44) ميكروغرام / مل لسلسلة المكورات العنقودية الذهبية. الإشريكية القولونية والمكورات العقدية على التوالي.

اظهرت الدراسة المضادة للفطريات على سلالات (*Cladosporium herbarum* , *Alternaria infectoria* , *Aspergillose* , *ochraceus* , *Trichophyton*) , نتائج مهمة . تحددت فعالية الزيت المدروس من خلال تحديد معدل تثبيط نمو الجذور , مما يدل على أن الزيت العطري له نشاط ضد جميع سلالات الفطريات التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية : الزيوت الاساسية, الفعالية المضادة للبكتيريا, الفعالية المضادة للفطريات, *GC/MS* , *Thymus Capitatus*

Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de la composition chimique et l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle (HE) d'une plante aromatique et médicinales de la flore algérienne (*Thymus Capitatus*), dans le but de rechercher de nouveaux produits bioactifs d'origine naturels jouissantes d'activités biologiques notamment les activités antimicrobienne et antifongique. L'HE a été obtenue par hydro distillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Le rendement en HE est de l'ordre de 1.56%, l'analyse de l'HE a montré que ses propriétés physicochimiques sont conformes aux normes. L'identification de sa composition chimique par GC/MS a ressorti 22 composants dont : Thymol (51.22%), Carvacrol (12.59%) et γ -Terpinene (10.3%) comme des composants majoritaires.

L'activité antibactérienne de l'HE a été évaluée par des tests in vitro sur un milieu Mueller-Hinton, vis-à-vis de quelques bactéries. L'huile de *Thymus Capitatus* a montré une meilleure activité antibactérienne que les antibiotiques commercial *Chloramphénicol*, *Cefoxitin*, *Gentamycine* contre toutes les bactéries. Les valeurs de CMI sont (29.44,14.72,14.72 et 7.36µg/ml) pour les souches de *Staphylococcus Salmonella Escherichia coli* et *Streptocoque* respectivement.

L'étude antifongique sur les souches *Cladosporium herbarum*, *Alternaria infectoria*, *Aspergillose ochraceus*, *Trichophyton* signalée des résultats importants et significatifs. On détermine l'efficacité de l'huile étudiée par la détermination du taux d'inhibition de la croissance mycélienne, qui montre que l'huile essentielle a un effet fongicide contre les souches *Cladosporium herbarum* et *Alternaria infectoria* et un effet fongistatique contre les souches *Aspergillose ochraceus*, *Trichophyton*.

Mots clés : Huiles essentielles ; Thymus Capitatus ; GC/MS ; Activité antibactérienne, Activité antifongique.

Abstract:

This work is part of the study of the chemical composition and antibacterial and antifungal activity of the essential oil (HE) of an aromatic and medicinal plant of the Algerian flora (*Thymus Capitatus*), with the aim to look for new bioactive products of natural origin enjoying biological activities including antimicrobial and antifungal activities. HE was obtained by hydro distillation using a Clevenger type apparatus. The yield of HE is of the order of 1.56%, the analysis of the HE has shown that its physicochemical properties are in conformity with the norms. The identification of its chemical composition by GC / MS revealed 22 components including: Thymol (51.22%), Carvacrol (12.59%) and γ -Terpinene (10.3%) as majority components.

The antibacterial activity of the HE was evaluated by in vitro tests on a Mueller-Hinton medium, with respect to a few bacteria. Thyme Capitatus oil showed better antibacterial activity than commercial antibiotics (*Chloramphenicol*, *Cefoxitin*, *Gentamycin*) against all bacteria. MIC values are (29.44, 14.72, 14.72 and 7.36 µg/ml) for *Staphylococcus Salmonella* strain. *Escherichia coli* and *Streptococcus* respectively.

The antifungal study on *Cladosporium herbarum* strains, *Alternaria infectoria*, *Aspergillose ochraceus*, *Trichophyton* reported significant and significant results. The effectiveness of the oil studied is determined by the determination of the rate of inhibition of mycelial growth, which shows that the essential oil has a fungicidal activity against all the strains tested.

Keywords: Essential oils; *Thymus Capitatus*; GC / MS; Antibacterial activity, antifungal activity.

Liste des figures

Figure 1: <i>Thymus Capitatus</i>	5
Figure 2: Structure chimique d'isoprène (C ₅ H ₈) _n	12
Figure 3: Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne.	14
Figure 4 : Montage d'extraction par hydrodistillation	16
Figure 5: Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau	17
Figure 6 : Montage d'extraction par hydrodiffusion.....	17
Figure 7 : Technique d'extraction par solvant	18
Figure 8 : Montage d'extraction par les fluides supercritiques.....	19
Figure 9 : Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes.....	19
Figure 10 : <i>Thymus capitatus</i>	22
Figure 11 : Diagramme générale de la procédure expérimentale.....	23
Figure 12 : Montage de l'extraction par hydrodistillation	24
Figure 13 : Appareil de Chromatographie CG /MS	28
Figure 14 : Protocole expérimentale de l'essai de l'activité antibactérienne.....	31
Figure 15 : Résultat de l'extraction de l'HE du <i>Thymus Capitatus</i>	34
Figure 16 : profile chromatographique de l'huile essentielle de <i>Thymus Capitatus</i>	37
Figure 17: Distribution en fonction du pourcentage des différents composants existant dans l'huile essentielle de <i>Thymus Capitatus</i>	39
Figure 18: les composéé organiques majeurs.....	40
Figure 19 : comparaison entre l'effet antibactérienne de l'huile essentielle et les	41
Figure 20 : l'effet de <i>Thymus Capitatus</i> sur les souches fongiques.....	44
Figure 21 : Cinétique de croissance mycélienne en fonction de temps et concentration des huiles essentielles de <i>Thymus Capitatus</i>	44
Figure 22:Taux d'inhibition des souches en fonction de la concentration.....	45
Figure 23: vitesse de la croissance mycélienne sous l'effet de l'augmentation de la concentration d'huile essentielle de <i>Thymus Capitatus</i>	46

Liste des abréviations

AFNOR	Association française de normalisation.
°C	Degrés Celsius.
C	Concentration.
Cm	Centimètre.
CMI	Concentration minimal inhibitrice.
DMSO	Dimethyl sulfoxide.
D	Diamètre
g	gramme.
GC/MS	Chromatographies phase gazeuse couplée au spectromètre de masse.
h	heur.
HE	huile essentielle.
I_A	indice d'acide.
MH	Muller-Hinton.
ml	millilitre.
PDA	Potato Dextrose Agar.
pH	Potentiel d'Hydrogène.
TI	taux d'inhibition.
TR	temps de rétention.
UFC	Unité Formant Colonie.
VC	vitesse de croissance mycélienne.
μ	Micro.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification et description botanique du <i>Thymus Capitatus</i>	5
Tableau 2: Compositions chimiques de l'huile essentielle de <i>T. Capitatus</i> dans le monde :.....	6
Tableau 3 : Situation géographique de site récolte.	22
Tableau 4 : Antibiotique utilisé dans chaque bactérie.....	29
Tableau 5 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés.....	30
Tableau 6 : Concentration expérimentées pour l'essai antifongique	32
Tableau 7 : Caractères organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Thymus Capitatus</i>	34
Tableau 8 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle	35
Tableau 9 : Composition chimique de l'Huile essentielle de <i>Thymus Capitatus</i>	38
Tableau 10 : Effet de la dilution de l'huile de <i>Thymus capitatus</i> sur les quatre souche.	42

SOMMAIRE

Liste des figures	I
Liste des abréviations	II
Liste des tableaux	III
SOMMAIRE	IV
Introduction Générale :	1
Chapitre I : Aspect botanique de <i>Thymus Capitatus</i> .	
I .1. Généralité :	4
I.2.La famille Lamiacées :	4
I.3.Le genre <i>Thymus</i> :	4
I .4.Description botanique:	4
I .5. Systématique :	5
I.6.Origine et distribution :	6
I .7. Noms vernaculaires :	6
I.8. Substances bioactives :	6
I.9. L'huile essentielle de <i>T. Capitatus</i> :	6
Chapitre II :Les huiles essentielles.	
II.1 . L'huile essentielle :	9
II.2. Définition d'une huile essentielle :	9
II.3. Répartition et localisation des huiles essentielles :	9
II.4. Rôle physiologique de l'huile essentielle chez la plante :	9
II .5. Conservation de l'huile essentielle :	10
II .6. Domaines d'utilisation :	10
II.7. Propriétés physiques des huiles essentielles :	10
II.8.Compositions chimiques des huiles essentielle :	11

II.8.1. Les terpènes	11
II.8.2. Les composés aromatiques :	12
II.8.3. Les composés d'origines divers :	12
II.9. Les activités biologiques :	12
II.9.1. Activité antibactérienne :	13
II.9.2- Activité antifongique :	14
II.10. Techniques d'extraction des huiles essentielles :	15
II.10.1. Extraction par hydrodistillation :	15
II.10.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :	16
II.10.3. L'hydrodiffusion :	17
II.10.4. Extraction par solvant :	18
II.10.5. Extraction par les fluides supercritiques :	18
II.10.6. L'extraction par micro-ondes :	19
II.10.7. Extraction par ultrasons :	20

Chapitre III : Matériel et méthodes.

III- Matériels et méthodes :	21
III.1. Préparation du matériel végétal :	22
III.2. Description de la région de récolte :	22
III.3. L'extraction de l'huile essentielle :	24
III.4. Caractéristiques des huiles essentielles :	24
III.5. Analyses physico-chimiques :	25
III.5.1. Détermination de rendement en huile essentielle :	25
III.5.2. Détermination de l'indice d'acide Afnor – NFT – 60- 2000 :	25
III.5.3. Mesure de pH :	26
III.5.4. Mesure de l'indice de réfraction (norme NF T 75-112) :	26
III.5.5. Mesure de la densité relative à 20 °C (Norme NF T 75-111) :	26

III.6. Identification des composées par GC/MS ::.....	28
III.7.Activités biologiques :.....	28
III.7.1.Activité antibactérienne :	28
III.7.1.1. Repiquage des souches bactéries :	28
III.7.1.2. Méthode de diffusion sur gélose :	29
III.7.1.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :	30
III.7.2.Activité antifongique :.....	31
III.7.2.1.Méthode de contact direct :.....	32
III.7.2.2. Evaluation de la croissance mycélienne : :.....	32
III.7.2.3.Détermination de l'indice antifongique :	33
III.7.2.4.Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC) :	33

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.1. Caractères organoleptiques :	34
IV.2. Rendement d'extraction :	34
IV.3. Résultats des analyses (Densité, pH, Indice de réfraction, Indice d'acide) :	35
IV.4. Analyses de l'huile essentielle :.....	36
IV.5. Activités antimicrobiennes :.....	40
IV.5.1 Activité antibactérienne :	40
VI.5.2. Activité antifongique :	43
VI.5.2.1. La cinétique de la croissance mycélienne :.....	44
VI.5.2.2. Indice antifongique :	45
VI.5.2.3. Vitesse de la croissance mycélienne :.....	46
Conclusion.....	49
Référence :.....	52
Annexe	0

INTRODUCTION GENERALE

Introduction Générale :

Depuis longtemps, les populations humaines utilisent les éléments de leur environnement, en particulier les plantes. De nos jours encore et malgré les progrès spectaculaires accomplis dans les domaines scientifiques, une bonne partie de la population mondiale, jusqu'à 80% dans les pays en voie de développement, a recours aux plantes pour se soigner[1].

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions de monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupées une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. Ces plantes sont utilisées, soit pour l'extraction des huiles essentielles, soit pour l'extraction de molécules particulières recherchées par l'industrie pharmaceutique, soit pour aromatiser dans l'industrie alimentaire[2].

Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse des molécules odorantes et volatiles qui consistent ce qu'on appelle les huiles essentielles[3], ces huiles sont utilisées comme une source de molécules bioactives d'origine naturelle jouissant d'activités biologiques notamment l'activité antimicrobienne, antioxydante, antiseptique et anti-inflammatoire[4].

Pour cet intérêt, les huiles essentielles considérées comme des substances naturelles bioactives occupent un bon choix dans la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques, et attirent l'intérêt de plusieurs recherches vu le nombre de leurs propriétés biologiques dénombrables. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative des produits de synthèse dans le traitement des maladies infectieuses et dans diverses pathologies associées au stress oxydant[4].

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des molécules d'origines végétales jouissant d'activités biologiques notamment les activités antibactériennes et antifongiques. Dans ce contexte, ce travail a pour objectif de l'étude d'huile essentielle d'une plante aromatique et médicinale *Thymus Capitatus* et l'évaluation de leurs activités biologiques notamment les activités antibactériennes et antifongiques.

Notre travail est réparti en deux parties :

- ✓ La première partie est relative à l'étude bibliographique de plante et des huiles essentielles.
- ✓ La deuxième partie représente la partie expérimentale où nous présenterons les techniques utilisées :
 - Extraction l'huile essentielle de *Thymus Capitatus* par l'hydrodistillation
 - Détermination de quelques caractéristiques physico-chimiques, et de la composition chimiques d'huile essentielle, par méthodes chromatographiques.
 - Le deuxième axe consiste à déterminer l'effet Antibactérienne et antifongique de notre huile essentielle.

Enfin les résultats obtenus des caractéristiques physico chimiques ; de la composition d'huile essentielle et leur activités antibactérienne et antifongique sont interprétés à la lumière de la littérature. Le travail est clôturé par une conclusion et des perspectives.

Chapitre I
Description Botanique
De Thymus
Capitatus

DESCRIPTION BOTANIQUE DE THYMUS CAPITATUS

I.1. Généralités :

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : méditerranéenne, saharienne et une flore paléo tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques[5]. Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne on s'est intéressé aux espèces de la famille des Lamiacées (*Thymus Capitatus*).

I.2. La famille Lamiacées :

La famille des Lamiacées comprend de 187 genres et de 3000 espèces. Elle est la plus homogène de la sous classe des Gamopétales, et la plupart des genres sont riches en huiles essentielles. L'ancien nom des Lamiacées, Labiées dérive du nom latin "labium" signifie lèvre, en raison de la forme particulière des corolles[6]

Cette famille est l'une des familles les plus utilisées comme source d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant [7].

Un très grand nombre de genres de la famille des Lamiacées sont des source riches en terpénoides, flavonoïdes, iridoïdes glycosylés et composés phénoliques[8] .

I.3. Le genre Thymus :

Le genre thymus regroupe un grand nombre d'espèces, sous-espèces et variétés de plantes sauvages. Plusieurs de ces espèces sont caractéristiques de l'aire méditerranéenne. Elles sont utilisées à l'état frais ou sec comme plantes culinaires. Leurs HE sont largement utilisées dans la médecine alternative grâce à leur propriétés antiseptiques, antispasmodique et antimicrobiennes [9].

Ce genre inclut environ 300 espèces à travers le monde dont 11 sont localisées en Algérie[10].

I.4. Description botanique :

C'est un arbrisseau nain à odeur fortement aromatique de 20-50 cm de haut, à rameaux dressés à érigés, ligneux, claire, jeunes blancs feutrés, souvent seules les touffes des aisselles feuilles.

Feuilles des longues pousses caduques si sècheresse, sessiles, presque triangulaires, linéaire, pointues, 6-12 cm de long, 1-1,8 mm de large, bord, plat, nu, ciliées à la base, les 2 faces vert-gris ponctués de glandes. Pseudo verticilles en inflorescences denses, Calice 1 mm de long, lèvre supérieure à 3 dents, plus courte qu'inférieure à 2 dents, toutes les dents ciliées. Tube calice, au contraire de toutes les autres espèces de *Thymus*. A 20-22 nervures. Aplaties au dos. Corolle rose-pourpre. Jusqu'à 1 cm de long, bilabée. Lèvre supérieure à 2 fentes. 4 étamines [11].

I.5. Systématique :

D'après Quezel et Santa la systématique de *Thymus Capitatus* se présente comme suit [12] :

Tableau 1 : Classification et description botanique du *Thymus Capitatus*.

Règne	Plantae
Embranchement	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Sous classe	Astériidae
Division	Magnoliophyta
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus Capitatus</i>



Figure 1: *Thymus Capitatus* [13]

I.6. Origine et distribution :

Il pousse spontanément dans le Nord de l’Afrique (Maroc, Tunisie, Algérie, et Libye), l’Egypte, l’Espagne ainsi qu’en Sibérie et en Europe Nordique [2].

I.7. Noms vernaculaires :

Origan d’Espagne, Thymbra Capitata, Thym à têtes, Zaatar, Thym, الزعتر او الصعتر.

I.8. Substances bioactives :

Il constituée les acides phénoliques : acide caféique [14], acide coumarinique [15].
Les flavonoïdes : hespéridine, eriotréicine, narirutine lutéoline. Les polyphénols : tanins [16].

I.9. L’huile essentielle de *T. Capitatus* :

Etant considérée comme une plante qui se caractérise par sa teneur importante en H.E ($\geq 1\%$), Notre recherche bibliographique nous a permis de recenser 16 travaux décrivant la composition chimique de l’huile essentielle de *T. Capitatus*. Les travaux réalisés sur la composition chimique de cette H.E ont montrés que le Carvacrol était caractérisé comme la substance active principale avec un pourcentage majoritaire qui dépasse les 55% en tous les régions méditerranées (Tableau 2). La composition chimique de l’échantillon provenant de la Tunisie est vraiment remarquable par l’absence totale de Carvacrol, le Thymol (89,06%) étant le constituant majoritaire (Tableau 2).

Tableau 2: Compositions chimiques de l’huile essentielle de *T. Capitatus* dans le monde :

	Pays	année	Réf	Les compositions
1	Algérie	2015	[17]	γ -terpinène(4,3%), <i>p</i> -cymène(12,4%), α -thujone(0.2%)
2		2018	[11]	Carvacrol (78,78%), <i>P</i> -cymène (6,62%), α -pinène (0,71%)
3	Italie	2007	[18]	Carvacrol(81%), <i>p</i> -Cymène(5%), γ -terpinène(3.2%),
4		2008	[18]	Carvacrol (57%) γ -terpinène(6.9%), <i>p</i> -cymène(8.6%)
5		2013	[19]	Carvacrol(81,52%-78,40%), <i>p</i> -cimène(4,98%), γ -terpinène(3,13%)
6		2015	[20]	Carvacrol (81.2–14.2%), γ -terpinène(34.4–2.6%), <i>p</i> -cymène(22.8-5.0%)
7	Maroc	2016	[21]	Carvacrol (13,4%), <i>p</i> -cymène (18,9%), α -pinène (2,9%)

8		2018	[22]	<i>p</i> -cymène (2,31%), Carvacrol (65,96%), γ -terpinène (0,67%)
9		2018	[23]	Carvacrol(55,59%) , <i>p</i> -cymène(11,23%), α -pinène(0,56%)
10	Tunisie	2007	[24]	Carvacrol (62-83%), <i>P</i> -cymène (5-17%), γ -terpinène (2-14%).
11		2008	[25]	Carvacrol(66%), α -pinene(67,71%), α -thujone(44%)
12		2010	[26]	Carvacrol (68,8%), α -pinène (12,5%), <i>P</i> -cymène (11,1%).
13		2010	[27]	Thymol (89,06%), <i>P</i> -cymène (5,04%), γ -terpinène (3,19%).
14		2011	[28]	Carvacrol (70%), β -caryophyllene (8,5%), γ -terpinène (4,3%).
15		2013	[29]	Carvacrol (58,66-81,49%), <i>P</i> -cymène (3,83-13,17%), γ -terpinène (7,81-3,16%).
16	Libya	2015	[30]	Carvacrol(68,19%),Thymol(12,29%)

Chapitre II :

Les huiles essentielles

II.1. L'huile essentielle :

Le terme ‘‘huile essentielle ‘‘ a été inventé au 16^{ème} siècle par le médecin suisse Parascelsus Von Hohenheim afin de désigne le composé actif d'un remède naturel [31]. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums [32].

II.2. Définition d'une huile essentielle :

La définition donnée par AFNOR en 2000 est la suivante : « les huiles essentielles sont des produits obtenus à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche ».

Les HE sont des substances d'origine végétale de composition complexe .Caractérisées par sa volatilité, huileuse et odorante, présentes dans les plantes aromatiques dans plusieurs endroits(dans les fleurs, les feuilles ,les fruits , les graines , l'écorce et les racine) [4].

II.3. Répartition et localisation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont rencontrées dans diverses familles botanique, elles sont largement répandues dans le monde végétal et se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles.

Ces essence se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante , dans une même plante , ces huiles peuvent exister à la fois dans différents organes, ou la composition chimique peut varier d'un organe à un autre .Ces essence aromatique sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante[33].

II.4. Rôle physiologique de l'huile essentielle chez la plante :

Beaucoup des plantes produisent les HE en tant que métabolites secondaires, leur rôle exact dans le processus de la vie de la plante reste encore mal connu. Les HE peuvent avoir plusieurs effets «utiles» pour la plante : attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, comme source énergétique, facilitant

certaines réactions chimiques permettant de conserver l'humidité des plantes désertiques, pour leur action répulsive sur les prédateurs [8].

II .5. Conservation de l'huile essentielle :

Les huiles essentielles de bonne qualité peuvent se conserver plusieurs années sous certaines condition .

Les huiles essentielles sont volatiles, il ne faut donc pas oublier de bien fermer les flacons .il est préférable de les conserver dans un flacon en aluminium ou en verre teinté (brun, vert ou bleu) et de garder à l'abri de la lumière à une température ambiante jusqu'à vingt degrés[34].

Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (norme AFNOR NF T 75-001 ,1996) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des HE (norme NF T 75-002 ,1996).

II .6. Domaines d'utilisation :

Les HE des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues[35].

Ils sont connus aussi pour leur effet antiseptique, bactéricide, virucide et fongicide, et leur propriété médicinale, ils sont utilisés dans l'embaumement, la conservation des aliments et comme agent antimicrobiens, analgésiques, sédatifs, des remèdes anti-inflammatoire, spasmolytique et anesthésiques localement [36-40].

II.7. Propriétés physiques des huiles essentielles :

Les HE possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques :

- ✓ Elles sont solubles dans : l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques.
- ✓ La densité est généralement inférieure à celle de l'eau
- ✓ Elles ont un indice de réfraction élevé

- ✓ Elles sont très altérables et sensibles à l'oxydation
- ✓ Elles sont liquides à la température ambiante
- ✓ Elles sont incolores sauf dans quelque cas où on trouve des huiles en jaune, en bleu (huiles essentielles de camomille), en vert (huile d'absinthe) et en rouge (huile volatile de cannelle).
- ✓ Elles sont volatiles ce qui différencie des huiles fixes [41].

II.8. Compositions chimiques des huiles essentielles :

Les HE sont des mélanges des structures extrêmement complexes, pouvant contenir plus de 300 composants différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les mono terpènes et les sesquiterpènes [8]

II.8.1. Les terpènes

Sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dedans leur squelette d'unités isopréniques à 5 atomes carbone (C_5H_8)_n. Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en **monoterpène** (C_5H_8)₂, **les sesquiterpènes** (C_5H_8)₃, **les diterpènes** (C_5H_8)₄, **les tétra terpènes** (C_5H_8)₈, les **poly terpènes** (C_5H_8)_n où n peut être de 9 à 30 [42].

Les terpénoïdes : sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide etc.)

Les monoterpènes : sont volatils, entraînable à la vapeur d'eau d'odeur souvent agréable et représentant la majorité des constituants des HE.

Les sesquiterpènes : il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes, elle contient plus de 3000 molécules .[42]

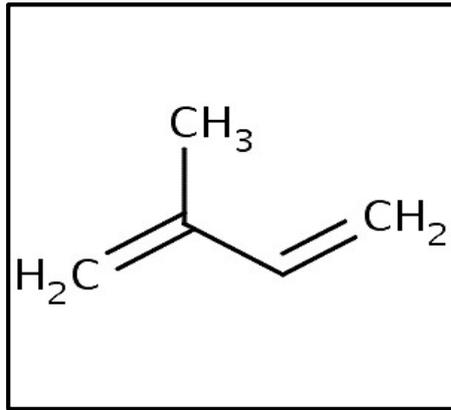


Figure 2: Structure chimique d'isoprène (C₅H₈)_n[4]

II.8.2. Les composés aromatiques :

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol, l'estragol, et bien d'autre [43].

II.8.3. Les composés d'origines divers :

Il existe nombre non négligeable de produits résultants de la transformation de molécules non volatiles issues de la dégradation des terpènes non volatiles qui proviennent de l'auto-oxydation [44].

II.9. Les activités biologiques :

Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités Fongicide, Insecticide, Herbicide, Bactéricide, Antioxydante...etc.

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydants, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses[45, 46].

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires[46].

Dans notre étude, nous nous sommes focalisés qu'à deux activités biologiques : les activités Antibactérienne et Antifongique.

II.9.1. Activité antibactérienne :

Un agent antimicrobien est une substance d'origine synthétique ou naturelle, utilisée pour la destruction ou l'inhibition de la croissance de micro-organismes, notamment des bactéries [47].

Beaucoup de plantes aromatiques et leurs huiles essentielles montrent une activité antimicrobienne qui pourraient empêcher la croissance des microorganismes d'altération et pathogènes, améliorant de ce fait la sécurité alimentaire[48, 49].

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement liée à leur composition chimique, en particulier de leurs composés volatils majeurs. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HEs. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HEs ait son propre mécanisme d'action.

Les caractéristiques des huiles essentielles sont attribuées aux dérivés terpénoides et phénylpropanoïdes dont elles sont constituées. L'activité de ces molécules bioactives dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées [50, 51].

Les terpènes ainsi que les flavonoïdes peuvent pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne et induire sa rupture. Le contenu cytoplasmique est déchargé à l'extérieur de la cellule impliquant sa destruction[52, 53]. Également, une perturbation chémo-osmotique

et une fuite de potassium intracytoplasmique peuvent survenir, suivi de la libération d'acides nucléiques, de l'ATP, et du phosphate inorganique [53-55]

D'une manière générale, l'action des huiles essentielles se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

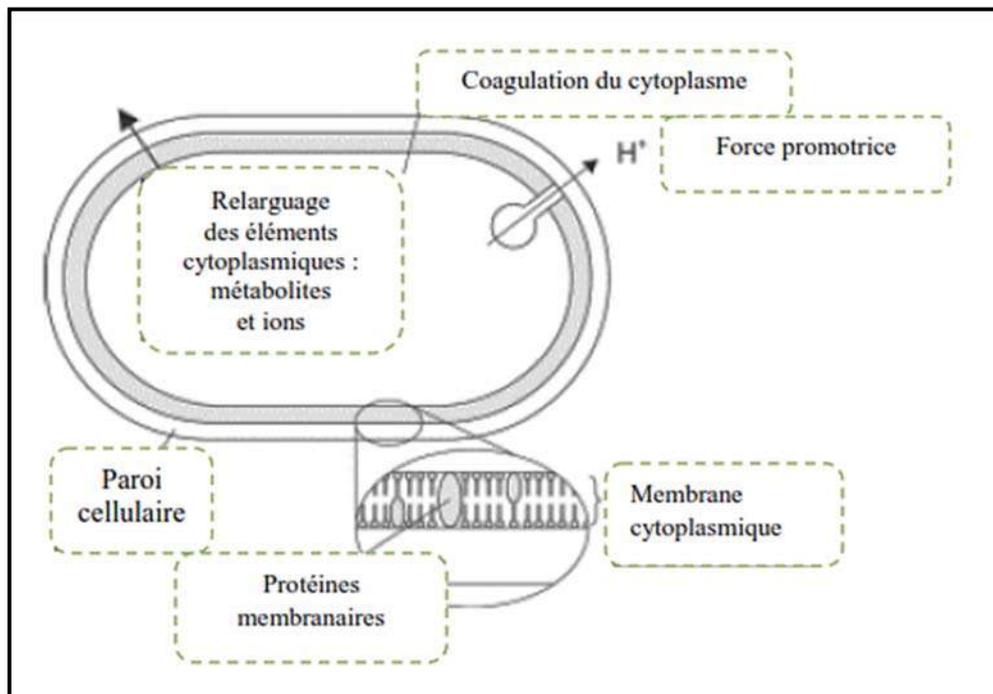


Figure 3: Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne[56].

II.9.2- Activité antifongique :

Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire [57].

Les huiles essentielles agissent sur un large spectre de moisissure et de levure en inhibant la croissance des levures et la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

L'étude de l'effet fongicide et fongistatique des huiles essentielles vis-à-vis de champignons pathogènes a fait l'objet de plusieurs travaux[58, 59]. Comme pour l'activité antibactérienne, le pouvoir antifongique est attribué à la présence de certaines fonctions chimiques dans la composition des HEs. L'action antifongique de ces composées est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure[60].

En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures[61].

Ils ont constaté également que les alcools et les lactones sesquiterpéniques avaient une activité antifongique.

II.10. Techniques d'extraction des huiles essentielles :

Il y a plusieurs méthodes différentes pour extraire les essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières et à la sensibilité considérable de leurs certains constituants. Le choix de méthodes la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de matière végétale à étudiée, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire et de l'usage de l'extrait.

Les principales techniques d'extraction sont :

II.10.1. Extraction par hydrodistillation :

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat [44] .

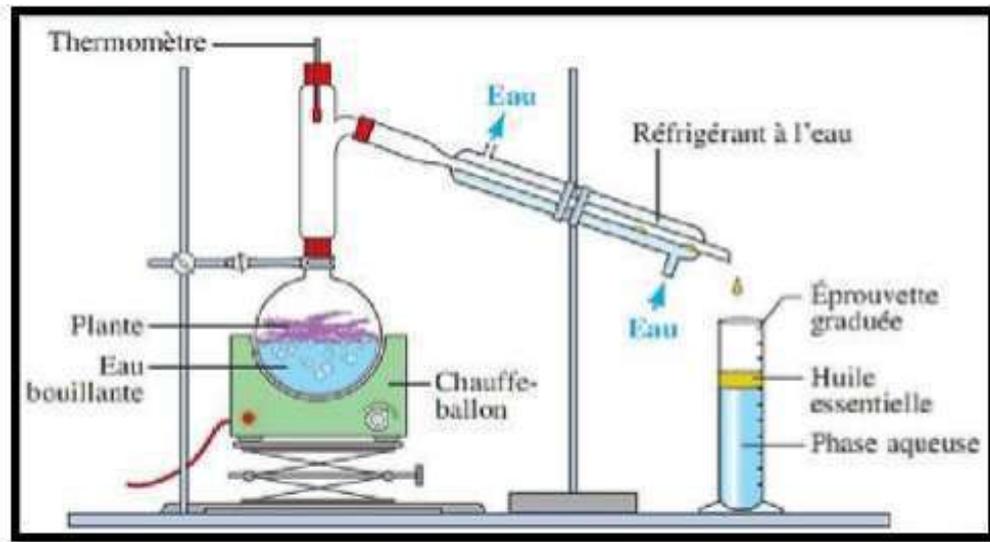


Figure 4 : Montage d'extraction par hydrodistillation[4]

II.10.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

A la différence de l'hydro distillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique'' l'huile essentielle''. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile[62].

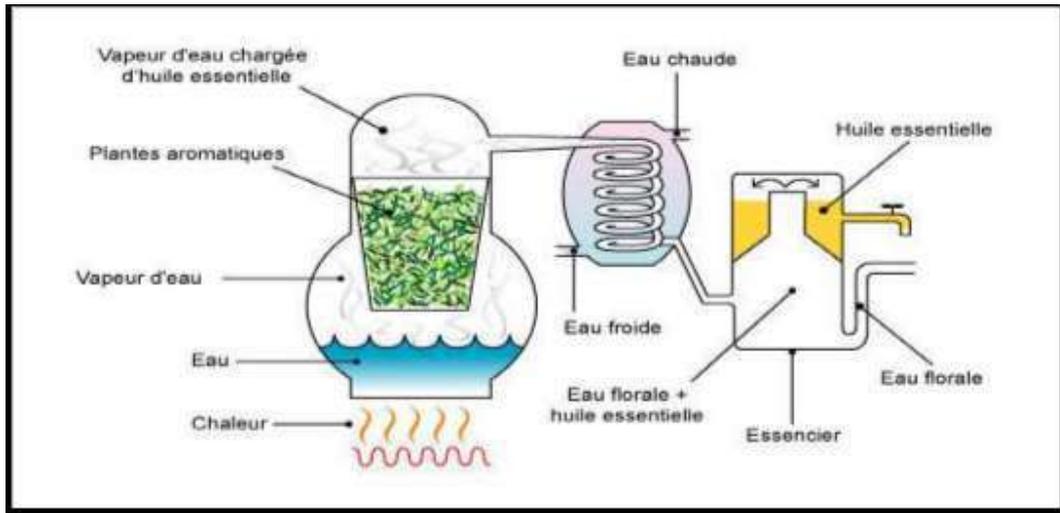


Figure 5: Montage d'extraction par entrainement à la vapeur d'eau[4]

II.10.3. L'hydrodiffusion :

Elle consiste à pulvériser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de la vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant[63].

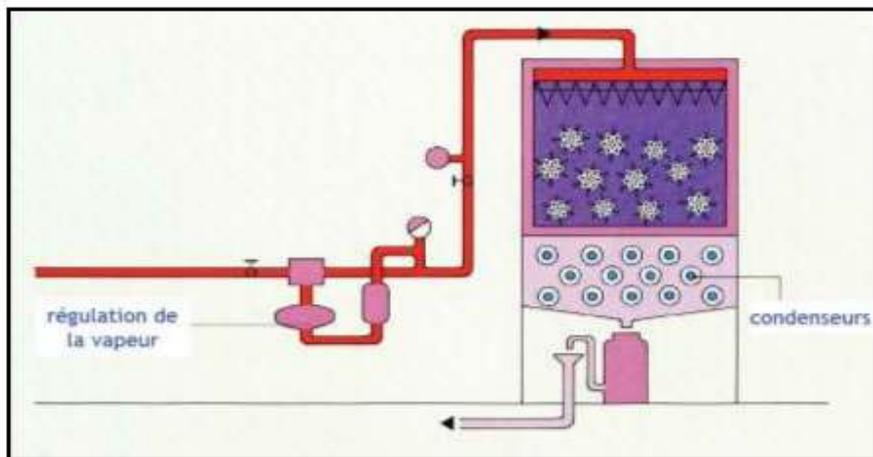


Figure 6 : Montage d'extraction par hydrodiffusion[4]

II.10.4. Extraction par solvant :

Cette technique consiste à la mise en contact dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va dissoudre et extraire les constituants solubles contenus dans la plante avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète». Le traitement de cette concrète par l'alcool absolu conduit à « l'absolue» [64, 65].

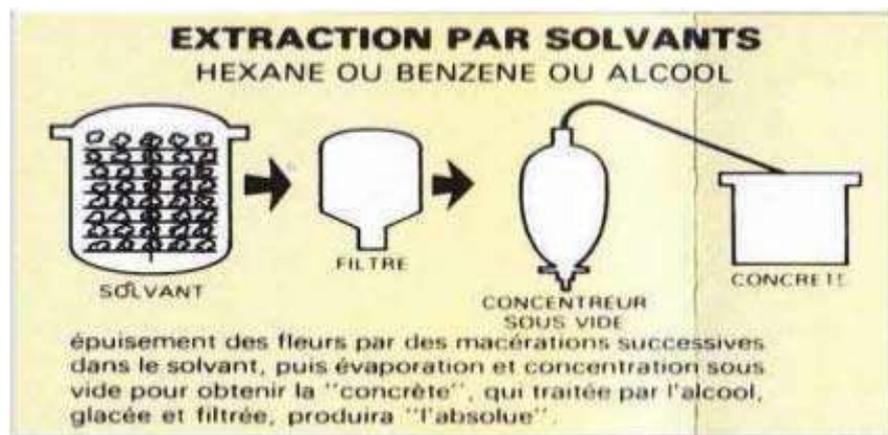


Figure 7 : Technique d'extraction par solvant [4]

II.10.5. Extraction par les fluides supercritiques :

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé, il s'agit de CO₂ supercritique. L'état supercritique (à T=31⁰C et P=73 bars), le CO₂ possède un bon pouvoir d'extraction.

C'est pourquoi cette technique est recommandée pour l'extraction des essences naturelles, car elle permet de travailler à des températures basses afin de ne pas altérer l'huile essentielle[66]. Dans ce système, le solvant est utilisé en boucle par interposition d'échangeurs de chaleur, d'un compresseur et d'un détenteur afin de porter le solvant à l'état désiré à chaque stade du processus. La séparation de l'extrait a lieu en phase gazeuse par simple détente[67].

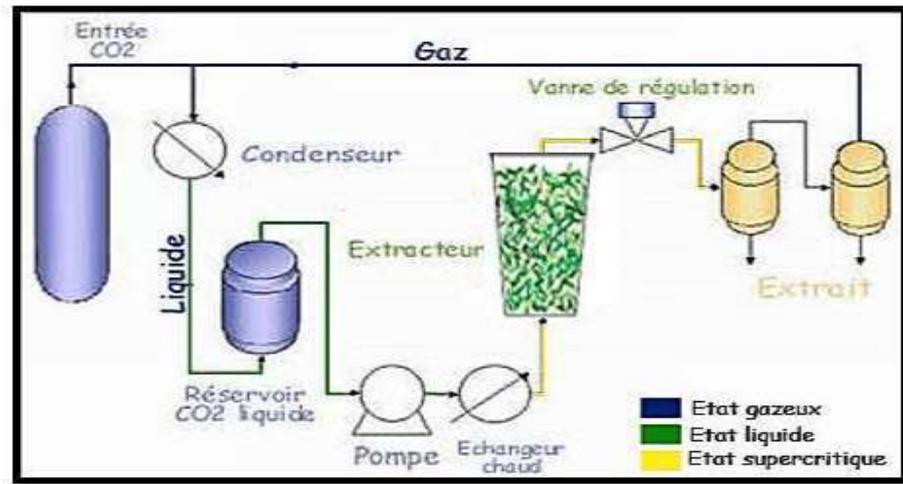


Figure 8 : Montage d'extraction par les fluides supercritiques[4]

II.10.6. L'extraction par micro-ondes :

C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances. Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant (non chauffé). On filtre et on récupère ensuite l'extraits[68].

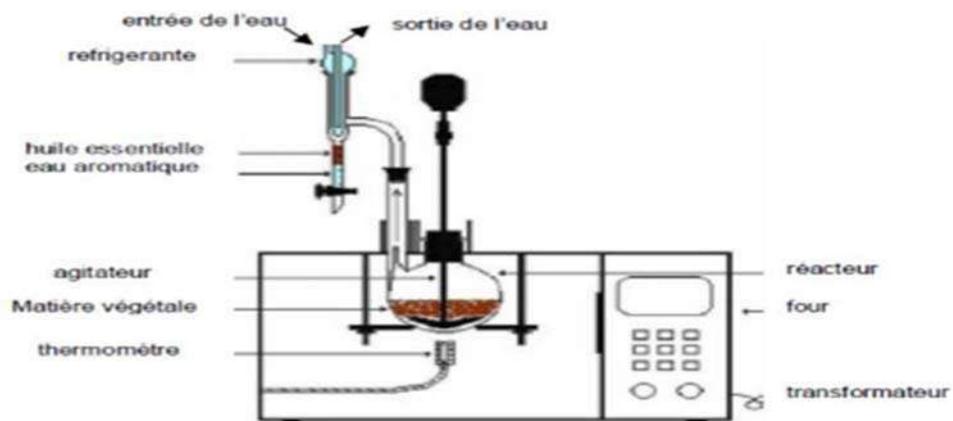


Figure 9 : Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes [65]

II.10.7. Extraction par ultrasons :

Les ultrasons génèrent des micro-cavitations qui désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines cellulosiques. Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation, des constituants des huiles essentielles. L'extraction par les ultrasons est une technique de choix, pour les solvants de faible point d'ébullition, à des températures d'extraction inférieures au point d'ébullition [68].

Chapitre III :

Matériel et Méthodes

III- Matériels et méthodes :

Ce présent travail a pour objectif de la recherche des molécules d'origines végétales jouissantes d'activités biologiques notamment l'activité antibactérienne et l'activité antifongique à base d'une plante aromatique et médicinale. Les thématiques de ce travail ont été réalisés au laboratoire de recherche de génie des procédés de la faculté des sciences appliquées de l'université de Ouargla.

Dans cette partie expérimentale nous avons présenté les deux axes de recherche :

- Le premier axe, est consacré à réaliser les analyses suivantes :
 - L'extraction et l'analyse de l'huile essentielles de la plante étudiée.
 - Caractérisations de l'huile essentielles par la méthode chromatographique en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC/MS).

- Dans le deuxième axe :
 - L'étude du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle et la détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI) après la solubilisation de l'huile essentielle dans un émulsifiant (DMSO).
 - L'étude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle vis-à-vis des souches fongiques et la détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI) après dilutions de l'huile essentielle dans le milieu de culture PDA.

III.1. Préparation du matériel végétal :

L'échantillonnage a été fait dans une région propre, loin de tout impact de pollution.

Après la récolte, la plante a été identifiée au laboratoire de recherche de génie des procédés de l'université d'Ouargla à l'aide de la flore d'Algérie de Quezel et Santa [12].

III.2. Description de la région de récolte :

La wilaya de Tiaret c'est un wilaya algérienne située dans l'ouest de pays dans la région des hauts plateaux.

Tableau 3 : situation géographique de site récolte.

Nom scientifique	Région de récolte	Altitudes(m)	Latitude	Longitude	Date de récolte
<i>Thymus Capitatus</i>	Tiaret	865	35.362222°	1.285555°	Février 2019



Figure 10 : *Thymus capitatus*

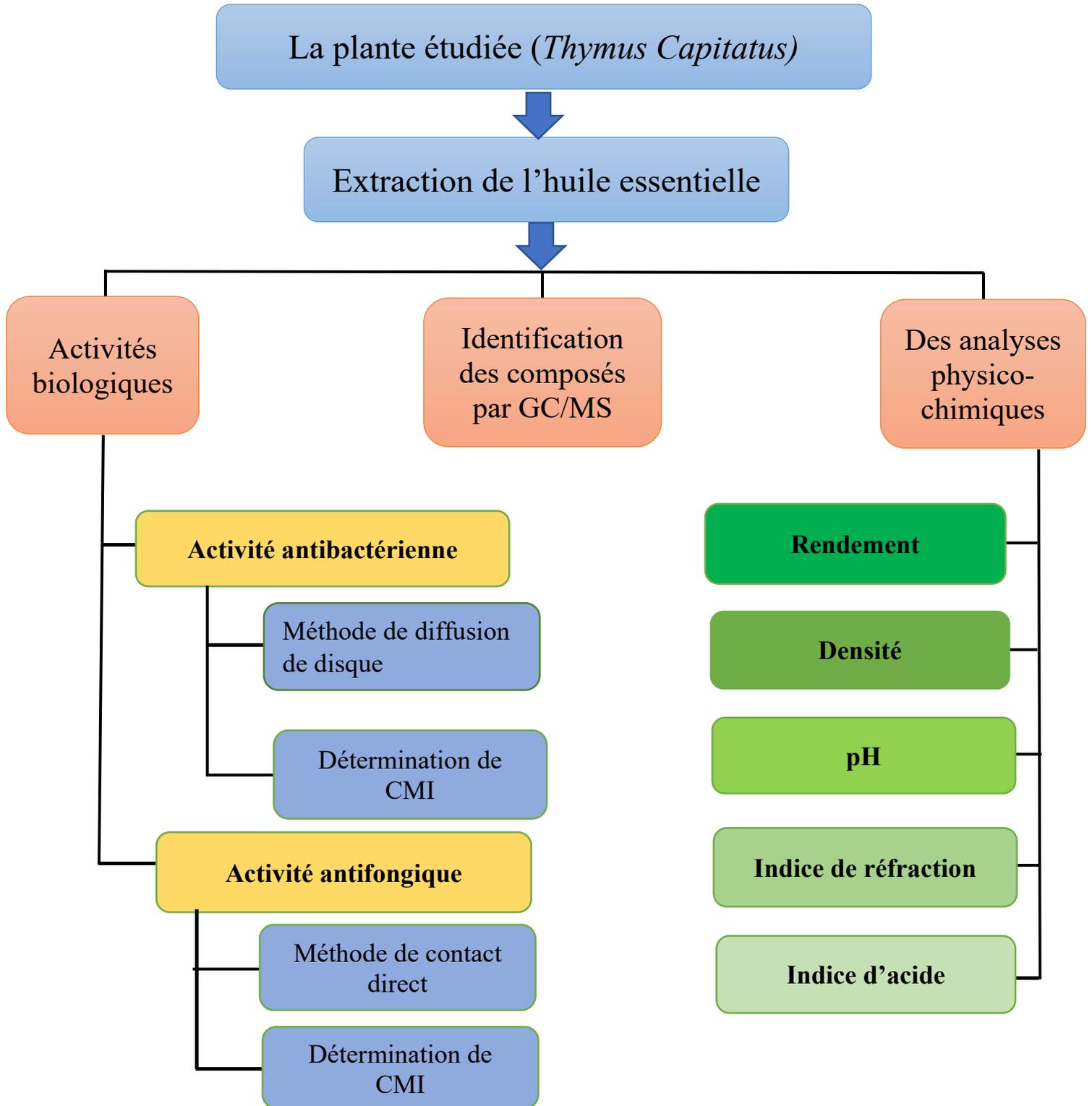


Figure 11 : Diagramme générale de la procédure expérimentale.

III.3. L'extraction de l'huile essentielle :

L'extraction a été effectuée par la méthode d'hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger, on place dans le ballon de 2L une quantité de *Thymus Capitatus* séchée $m_0 = 100\text{g}$, Immersée par un volume suffisant d'eau, le ballon est porté à l'ébullition pendant 3 heures, on réglant tout d'abord la température de chauffe ballon au maximum jusqu'à où le contenu du ballon bouillie puis on diminue la température au moitié ce qui entraîne l'éclatement des cellules végétales et le dégagement de la vapeur qui passe et condense par le réfrigérant, l'essence et l'hydrolat recueillies dans une ampoule à décanter. On récupère l'huile obtenue est conservée à l'abri de la lumière et la chaleur.



Figure 12 : Montage de l'extraction par hydrodistillation

III.4. Caractéristiques des huiles essentielles :

La caractérisation d'une huile essentielle consiste à :

- ✓ Déterminer les caractéristiques organoleptiques (Aspect, Couleur, Odeur, et le Saveur)
- ✓ Déterminer les indices physiques (Rendement, Densité, Indice de réfraction et l'Indice d'acide)
- ✓ Déterminer le profil chromatographique et la quantification relative des différents constituants.

III.5. Analyses physico-chimiques :

III.5.1. Détermination de rendement en huile essentielle :

L'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles de plantes étudiées a été menée chaque jour, pour définir la valeur maximale du rendement en fonction du temps de séchage et dans les mêmes conditions de travail. Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal utilisé pour cent. Après récupération de l'huile, le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R^{dt} = (m/m_0) * 100$$

R^{dt}: rendement en huile essentielle (en%) pour 100g de la matière végétale sèche.

m: masse d'huile essentielle récupérée (g).

m₀: prise d'essai du matériel végétal (g)[4].

III.5.2. Détermination de l'indice d'acide Afnor – NFT – 60- 2000 :

Ce paramètre est une variable qui dépend essentiellement des conditions de conservation et surtout des conditions d'extraction. Il est défini comme étant le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. La mesure d'indice d'acide est réalisée par titrage où les acides libres sont neutralisés par une solution d'Éthanol titrée de KOH [69] .

Le mode opératoire consiste d'introduire g d'huile essentielle dans une fiole où on ajoute 5 ml d'éthanol. Puis, on fait l'agitation et le titrage avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée (C (KOH)=0.1 mol/l), avec des gouttes de phénolphthaléine (indicateur coloré). La couleur jaune clair du liquide (la couleur de l'huile essentielle) vire à la neutralisation vers une couleur rose. Le volume de KOH qui a servi à la neutralisation est lu directement à la burette. L'indice d'acide est exprimé par la formule suivante :

$$I_A = \frac{(56.11 * N * V)}{m}$$

N : normalité de KOH

V : volume en ml de la solution éthanolique de KOH utilisée pour le titrage.

m : masse en gramme de l'huile essentielle.

III.5.3. Mesure de pH :

pH l'abréviation de potentiel d'hydrogène mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H⁺) en solution. Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un pH- mètre.

III.5.4. Mesure de l'indice de réfraction (norme NF T 75-112) :

Les mesures ont effectuées à l'aide d'un réfractomètre d'Abbé Prisma-CETI convexe. L'indice de réfraction n_D à la température de référence t est donné par la formule suivante :

$$[n]_D^t = n_D^{t'} + 0,00045 (t' - t)$$

Où :

n_D^t : est l'indice de réfraction de référence.

$n_D^{t'}$: est l'indice de réfraction mesurée.

t : température de référence qui est à 20

t' : température au moment de la mesure [69].

III.5.5. Mesure de la densité relative à 20°C (Norme NF T 75-111) :

La densité relative de l'HE est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C et la masse égale de volume d'eau distillée à 20°C. cette grandeur est sans dimension et son symbole est de d_{20}^{20}

La densité est mesurée à l'aide d'un densimètre et quand la détermination est effectuée à une température différente de 20°C, on effectue la correction à 20°C par le biais de la formule :

$$d_{20}^{20} = d_{20}^{t'} + 0,00068(t' - t)$$

Où : d_{20}^{20} : la densité mesurée a la température 20°.

dt' : La densité mesurée.

t' : température au moment de la mesure.

t : température de référence qui a 20° .

III.6. Identification des composées par GC/MS :

L'analyse de l'huile essentielle a été effectuée au laboratoire de recherche de génie des procédés de l'université Kasdi Merbah Ouargla, l'appareil utilisé est un chromatographe en phase gazeuse type (Bruker SCION 436 GC) couplé à un spectromètre de masse, la fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV, la colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS ($15m \times 0.25mm$).

L'épaisseur du film est de $0.25\mu m$. La phase stationnaire de la colonne est constituée de :5%Phényl et 95% dimethylpolysiloxane .

Les conditions opératoires sont :

- La température de l'injecteur (mode split 1 :50) : $250^\circ C$.
- La programmation de température :de $70^\circ C$ à $280^\circ C$ à raison de $10^\circ C/min$.
- Le gaz vecteur utilisé est l'Hélium avec un débit de 1,5 ml/min.

La température de la source du quadripôle sont fixées, respectivement, à $250^\circ C$ et à $220^\circ C$.

Les indices de rétention linéaires (RI) pour tous les composés ont été déterminés en utilisant n-alcanes comme standards.

L'identification des différents constituants a été réalisée en comparant leurs spectres de masse à ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles (NIST et Wiley).



Figure 13 : Appareil de Chromatographie GC /MS

III.7. Activités biologiques :

III.7.1. Activité antibactérienne :

Les tests d'activité antibactérienne ont été réalisés dans le laboratoire d'analyses médicales de Dr Cherbi.H district Sidi Bel Abbese, Ouargla.

Le matériel microbiologique est constitué de quatre souches bactériennes pathogènes, responsables de certaines maladies infectieuses graves. Ces bactéries sont *Escherichia coli*, *salmonella*, *Staphylococcus* et *Streptocoque*. Elles proviennent du laboratoire de microbiologie de l'Université Kasdi Merbah, Ouargla.

III.7.1.1. Repiquage des souches bactéries :

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées [70].

III.7.1.2. Méthode de diffusion sur gélose :

La méthode de disque est une méthode de diffusion des produits à tester à partir d'un disque de papier Whatman N⁰03 qui permet de mesurer qualitativement la sensibilité des souches aux effets antimicrobiens [71] . !!!

La méthode des disques est choisie dans cette étude pour sa fiabilité et sa simplicité. Cette méthode nous fournit des résultats préliminaires sur la sensibilité des souches et les activités antibactériennes du produit, grâce aux diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des disques mesurés en millimètres.

Les souches bactériennes sont préparées dans des milieux de culture appropriés et adaptées aux normes. Les disques imprégnés dans l'huile essentielle après sont déposés à la surface de ces milieux et incubés à 37⁰C pendant 24 heures tous les essais sont effectués à trois reprises.

On utilise des disques d'antibiotique (comme une référence de contrôle) :

Tableau 4 : Antibiotique utilisé dans chaque bactérie.

Espèce	Référence
<i>Escherichia coli</i>	CLORAMPHENICOL
<i>Salmonella</i>	CLORAMPHENICOL
<i>Staphylococcus</i>	CEFOXITIN
<i>Streptocoque</i>	GEMTAMYCINE

Expression des résultats : La mesure du diamètre des zones d'inhibitions est transcrite dans différents symboles à l'activité (**Tableau 5**) [72, 73]

Tableau 5 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés

Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité du germe
< 8	-	Résistant
9-14	+	Sensible
15-19	++	Très sensible
> 20	+++	Extrêmement sensible

Pour chaque boîte la mesure de la zone d'inhibition indique la sensibilité de ces bactéries, nous avons deux actions proposées à se produire :

Soit une action bactéricide où nous ne remarquons aucune croissance bactérienne autour des disques.

Soit une action bactériostatique, dont il y'a des zones d'inhibition autour des disques disposés sur la surface de milieu de culture ; seules les bactéries montrant une sensibilité à notre huile essentielle sont sélectionnées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).

III.7.1.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La CMI de notre huile essentielle a été déterminée, selon Benabderrahmane, Benali [41], pour les souches bactériennes, par la diffusion en gélose Mueller-Hinton, avec quelques modifications ; l'huile essentielle est diluée dans le DMSO (Dimethyl sulfoxide) afin d'obtenir une gamme de concentration de 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 et 1/128 mg/ml, puis incorporées dans des disques de 6.0 mm de diamètre à raison de 10 µL du produit. Le même volume de DMSO est utilisé comme témoin.

Les suspensions microbiennes sont préparées selon les normes suivantes :

0.5 McFarland qui est équivalente à (10^8 UFC/ml)

0.1 ml d'inoculum est immédiatement ensemencé dans la gélose à l'aide d'un écouvillon stérile.

Les disques contenant les différentes concentrations d'HE sont placés directement à la surface de la gélose. Les durées et les températures d'incubation sont de 24 heures et de 37 °C. la CMI est la

concentration la plus faible de l'HE reprise pour inhiber complètement la croissance des microorganismes testés autour du disques. Tous les essais, sont répétés à trois reprises.

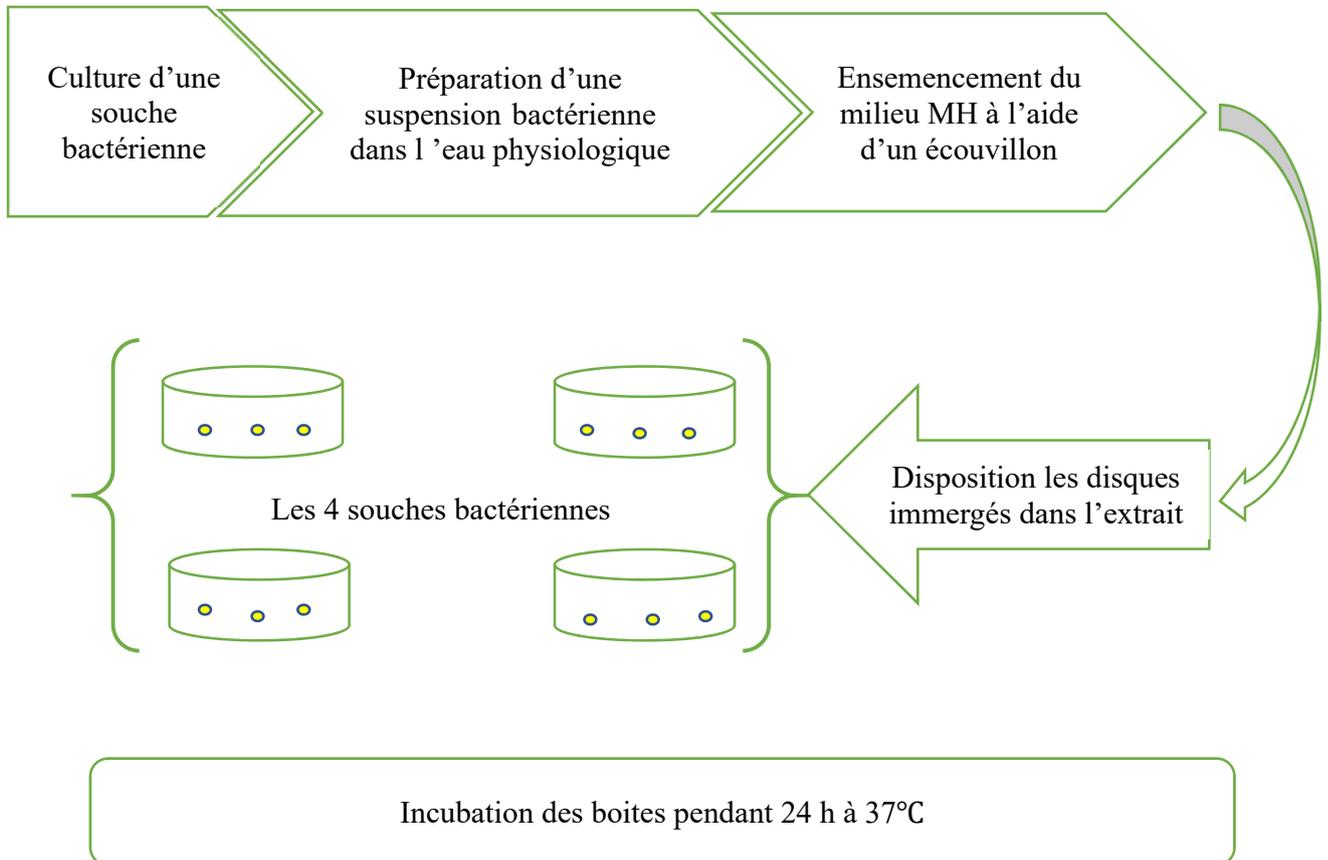


Figure 14 : Protocole expérimentale de l'essai de l'activité antibactérienne

III.7.2. Activité antifongique :

Cette activité est réalisée dans laboratoire d'Analyse et de Contrôle de qualité, Zawia 02 Rouissat Ouargla.

Le matériel microbiologique est constitué de quatre souches de champignons. Ces fongs sont *Cladosporium herbarum*, *Alternaria Infectoria*, *Trichophyton Sp* et *Aspergillose Ochraceus*.

Elles proviennent du laboratoire de microbiologie de l'Université Kasdi Merbah, Ouargla.

III.7.2.1. Méthode de contact direct :

L'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles est adoptée par la méthode de contact direct où les cinq concentrations sont obtenues par l'addition de 7.5, 15, 75, 150 et 225 μl d'huiles essentielles à 30ml PDA tiède dans un flacon avec l'ajout des gouttes Tween 20. La technique consiste à additionner l'huile à différentes concentrations (tableau 06) au milieu de culture encore liquide puis une agitation pendant 5 minutes est faite pour homogénéiser le milieu PDA avec l'huile essentielle. Après agitation des flacons, le mélange (PDA+ HE + Tween 20) est coulé dans des boîtes pétries.

L'inoculation se fait sous la hotte par dépôt au centre de la boîte d'un disque du mycélium d'environ 0.6 cm de diamètre ; les témoins (souches fongiques + PDA + Tween 20) sont réalisés dans les mêmes conditions sans huile essentielle et les mesures sont prélevées après 72 h d'incubation. Ces boîtes (témoins et essais) sont mises à une incubation à 25 ± 2 °C respectivement pour 7 jours [74].

Tableau 6 : Concentration expérimentées pour l'essai antifongique.

	Concentration en $\mu\text{l}/30\text{ml}$	Concentration en % (v/v)
Huile essentielle	7.5	0.025
	15	0.05
	75	0.25
	150	0.5
	225	0.75

v/v : volume de l'huile essentielle/ volume de PDA.

III.7.2.2. Evaluation de la croissance mycélienne :

La croissance mycélienne a été évaluée toutes les 24 h en mesurant le diamètre perpendiculaire passant par le milieu de rondelle.

Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins qu'ils ont démarrés le même jour et dans les mêmes conditions. Toute pousse même légère de champignons sera considérée

comme action négative c'est-à-dire que l'huile essentielle en question n'est pas inhibitrice vis-à-vis de la croissance fongique.

III.7.2.3. Détermination de l'indice antifongique :

Après l'incubation en tenant compte de la croissance de témoin, on calcule l'indice antifongique qui est déterminé par la formule suivante [75] :

$$TI(\%) = 100 * (dC - dE)/dC$$

TI (%) : Taux d'inhibition exprimé en pourcentage

dC : Diamètre de la zone de croissance du témoin

dE : Diamètre de la zone de croissance de l'essai (l'extrait des plantes)

III.7.2.4. Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC) :

Selon Cahagnier et Richard-Molard [75, 76], la vitesse de la croissance mycélienne de chaque concentration est déterminée par la formule suivante :

$$VC = \left[\frac{D1}{Te1} \right] + \left[\frac{D2 - D1}{Te2} \right] + \left[\frac{D3 - D2}{Te3} \right] + \dots + \left[\frac{Dn - D_{n-1}}{Ten} \right]$$

D : diamètre de la zone de croissance du chaque jour.

Te : jour d'incubation.

Chapitre VI :

Résultats et Discussion

IV.1. Caractères organoleptiques :

Les caractères organoleptiques de notre huile essentielle sont rassemblés dans le tableau 07

Tableau 7 : Caractères organoleptiques de l'huile essentielle de *Thymus Capitatus*

	Caractéristiques
L'aspect	Liquide mobile limpide
Couleur	Jaune pâle
Odeur	Aromatique, phénolique et épicée



Figure 15 : Résultat de l'extraction de l'HE du *Thymus Capitatus*.

IV.2. Rendement d'extraction :

Nous rappelons que HE a été extrait à partir de la partie aérienne de la plante par un hydro distillateur de type Clevenger. Le rendement moyen en HE a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la plante étudiée; cette dernière a fourni un taux d'environ 1,56% .On constate que ce taux est faible par rapport à celui obtenu à partir *Thymus Capitatus* du Maroc qui égale à 2.05% [77], aussi qui obtenu de

la région Matmata au sud-est de la Tunisie qui égale à 2.75% [25]. Selon Hoffmanns. & Link, le *Thymus Capitatus* qui récolté de la floraison dans quatre régions distinctes de Calabre ayant des conditions climatiques et une altitude différente se situent entre 3.02% et 3.44% avec un maximum de 4.65 % [19].

Il faut noter que le rendement et la composition chimique des HE dépendent plusieurs facteurs à savoir l'espèce, les conditions écologiques et géographiques, à l'âge de la plante, au stade du cycle végétatif, au moment de la récolte et à la méthode d'extraction[78].

IV.3. Résultats des analyses (Densité, pH, Indice de réfraction, Indice d'acide) :

La valeur commerciale d'une HE en générale est estimée et contrôlée d'après ses caractéristiques organoleptiques et ces "indices physico-chimiques". Ces derniers sont déterminés selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'association française de normalisation (A.F.N.O.R). Les résultats obtenus sont portés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle

	Résultats obtenus	Norme AFNOR
pH	5	5-6.5
Densité d_{20}^{20}	0.942	Norme NF T 75-111
Indice d'acide I_A	1.846	Norme NFT-60-2000
Indice de réfraction n_d^t	1.5099	Norme NF T 75-112

Selon le tableau 08 :

Le pH ou le potentiel d'hydrogène de notre HE est 5, alors cet HE est de nature acide. Le pH joue un rôle très important au cours des réactions chimiques et biochimiques, et influencer sur les propriétés stabilisatrices d'une HE (effets antioxydants et antimicrobien). Donc ce résultat nous donne un bon caractère de stabilisation contre les microorganismes.

La densité relative à 20°C de notre huile essentielle est de 0.942, on remarque qu'elle est proche à celle de l'eau. Cette caractéristique physique est un critère de pureté mais elle reste toujours insuffisante pour l'identification des huiles.

L'indice de réfraction de notre HE est 1.5099 il est normatif selon les standards français des huiles essentielles. Cet indice dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'insaturation et de la température, il varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé.

L'indice d'acide indique le comportement et la quantité des acides libres présentent dans notre HE qui exprime d'une part le degré de conservation d'une huile, et d'une autre par la qualité d'huile alimentaire. La norme A.F.N.O.R a fixé cet indice à une valeur inférieur ou égale à 2.

Les résultats obtenus indiquent que les paramètres physico-chimiques de l'huile essentielle de la plante analysés se retrouvent dans les fourchettes des références établies par les normes.

Ces caractéristiques physico-chimique et organoleptiques restent insuffisantes pour la caractérisation de notre huile essentielle, donc il est nécessaire de faire des analyses chromatographiques GC/MS pour analyser structurellement et identifier qualitativement notre HE.

IV.4. Analyses de l'huile essentielle :

La caractérisation de l'HE a été réalisée par GC/MS. Les pics du chromatogramme de l'huile essentielle est comparé à ceux des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre avec une banque de données informatisées, l'appareil GC/MS nous a donné les différents spectres de masse et les indices rétention des substances comparables qui peuvent constituer cet extrait[4].

Le chromatogramme de l'huile essentielle a de nombreux pics et beaucoup d'entre eux se chevauchent, le profil chromatographique est illustré dans la figure 16.

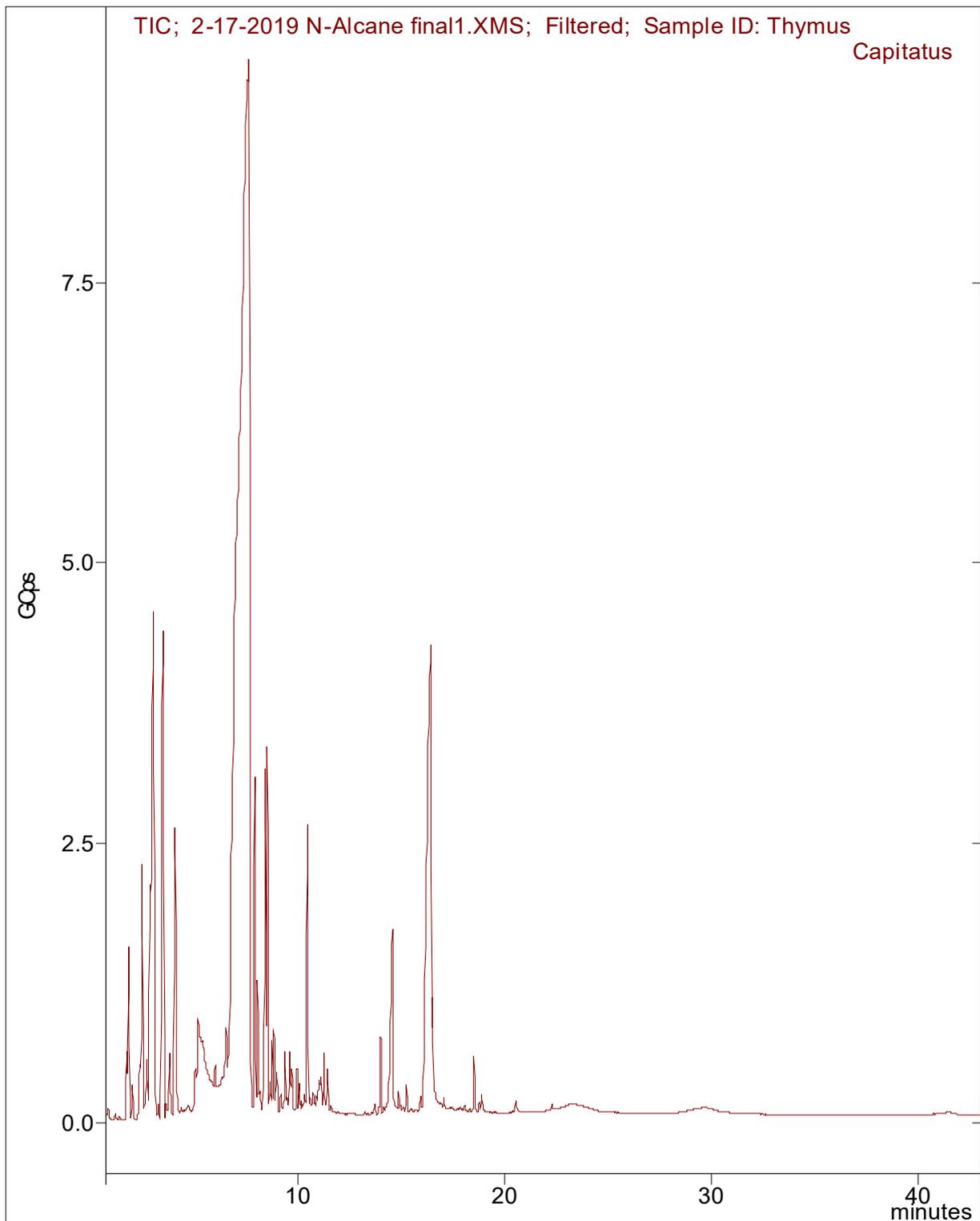


Figure 16 : Profile chromatographique de l'huile essentielle de *Thymus Capitatus*

Les résultats des analyses qualitative et quantitative de l'extrait permis de séparer et identifier de nombreux constituants où sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : Composition chimique de l'Huile essentielle de *Thymus Capitatus*

Compounds	RT	Area %
Alpha-thujene	1,716	0,38
.alpha.-Pinene	1,804	0,91
Camphene	1,99	0,2
beta.-Myrcene	2,465	1,49
alpha-terpinene	2,852	1,78
gamma.-Terpinene	3,479	10,3
Linalool	4,047	2,29
Terpineol	6,52	0,37
Thymol	7,557	51,22
Carvacrol	8,038	12,59
alpha-gurjunene	8,335	0,26
Caryophyllene	8,53	2,01
(+)-Ledene	9,372	0,34
beta.-Bisabolene	9,589	0,3
beta-copaene	9,64	0,12
delta-Amorphene	9,703	0,24
alpha-Bisabolene	9,961	0,23
Elemicin	10,057	0,14
(-)-Spathulenol	10,434	0,87
Caryophyllene oxide	10,461	1,21
Pentadecanoic acid	14,564	1,92
trans-13-Octadecenoic acid	16,414	9,04
Total		98,21

RT : Temps de rétention

Les analyses chromatographiques de l'huile essentielle ont permis d'identifier vingt-deux composés qui représentent environ 98.21% d'essence totale.

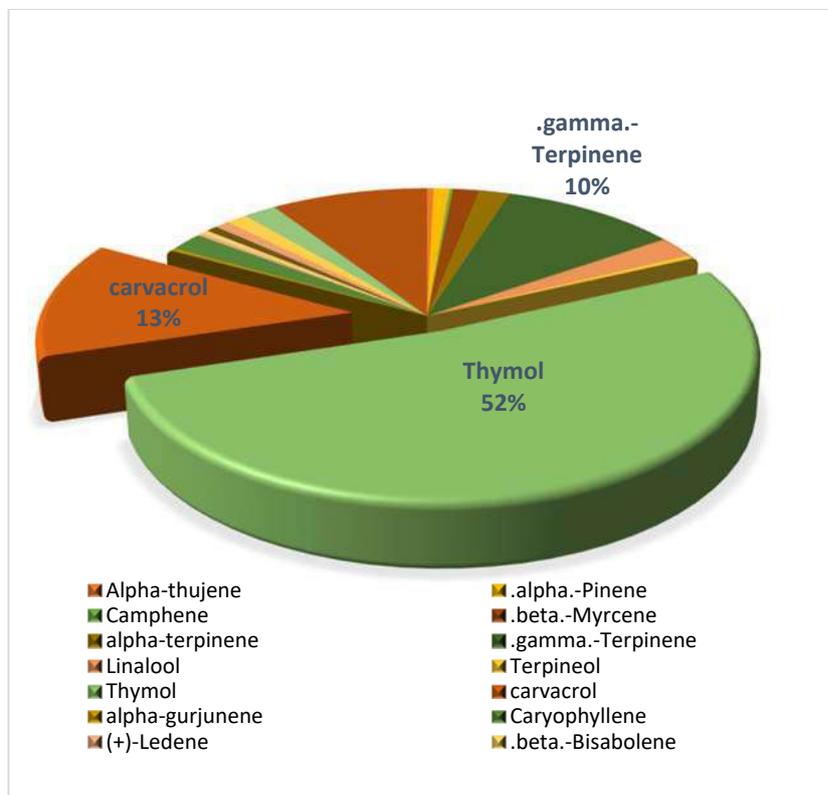


Figure 17: Distribution en fonction du pourcentage des différents composants existant dans l'huile essentielle de *Thymus Capitatus*.

Les résultats d'analyse montrèrent que les principaux composants de l'HE étaient le Thymol 51.22% comme composé majoritaire, suivi du Carvacrol 12.59% et du gamma.Terpinène 10.3%. Accompagnés d'autres constituants à des teneurs faibles : trans-13-Octadecenoic acide 9.04%, Linalool 2.29 %, Caryophyllene 2.01%, Pentadecanoic acide 1.92%, alpha -Terpinene 1.78%, beta- Myrcene 1.49 %, Caryophyllene oxyde 1.21% et les autres composés étaient représentés à l'état de trace à moins de 1 % de l'huile totale ce qui signifie que l'HE de *Thymus Capitatus* récolté à Tiaret (l'Ouest d'Algérie) est de Thymol chemo-type.

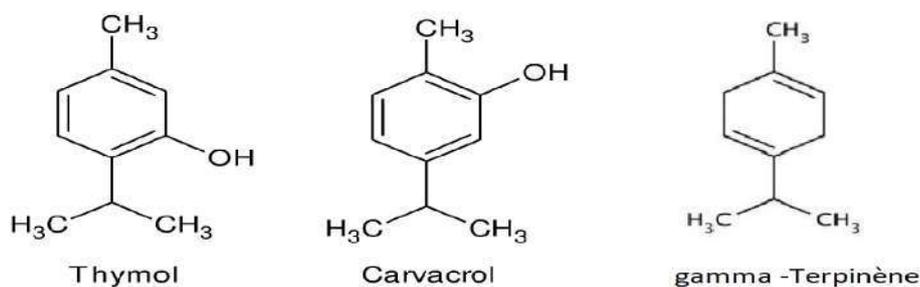


Figure 18: Les composéé organiques majeurs[79].

La composition de l'HE a démontré des tendances non similaires à celles qui sont publiées pour d'autres régions ont montré qu'il existe plusieurs chémotypes pour cette même espèce comme l'HE de *Thymus Capitatus* qui récolte de Mesghana, Tizi Ouzou est constituée de Thymol (25.82%), Linalool (23.40%), et de Géraniol (14.22%) [78].

Dans autres pays de monde on prend comme exemple l'huile essentielle de *Thymus Capitatus* de Zintan -Lybie qui constituées majoritairement en Carvacrol (68.19 %), Thymol (12.29%), gamma-Terpinène (3.09%) [80]. Aussi l'HE de Colombie est constituée principalement en Carvacrol (59.3%),p-Cymene(13.2%), gamma-Terpinène (8.7%) et de Thymol (6.4%)[81].

Dans plusieurs étude, il a été rapporté que les monoterpènes (Thymol, Carvacrol, Linalool, alpha-Terpinol ...) exercent une activité antimicrobienne, antivirale et antifongique [81].

IV.5. Activités antimicrobiennes :

L'activité antimicrobienne de l'extrait de *Thymus Capitatus* a été évaluée sur huit souches microbiennes (bactéries et champignons), cette activité a été réalisée par la méthode de diffusion en gélosé pour les bactéries et la méthode de contact direct pour les champignons, le pouvoir antimicrobien a été obtenu par la mesure des diamètres des zones d'initiations (D) en centimètre pour les bactéries et des diamètres croissance mycélienne pour les champignons.

IV.5.1 Activité antibactérienne :

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus Capitatus* vis-à-vis des bactéries sont résumé en annexe (4). L'action inhibitrice se traduit par l'apparition d'une zone

d'inhabitation autour du disque de papier imprégné d'extrait brute étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre. Comme a été rapporté dans littérature. Nous avons considéré qu'un extrait possède une action bactériostatique ou bactéricide si son diamètre d'inhibition est supérieur à 9 mm (tableau 4) [72].

L'huile essentielle de *Thymus Capitatus* a montré une très forte activité envers les quatre souches (*E. colé*, *salmonella*, *streptocoque*, *staphylocoque*).

D'après la figure 19, on constate que les zones d'inhibition de *Thymus Capitatus* sont importantes par rapport les antibiotiques utilisées ce qui montre leur pouvoir antibactérien (bactéricide), les résultats indiqués sont les moyens des trois mesures.

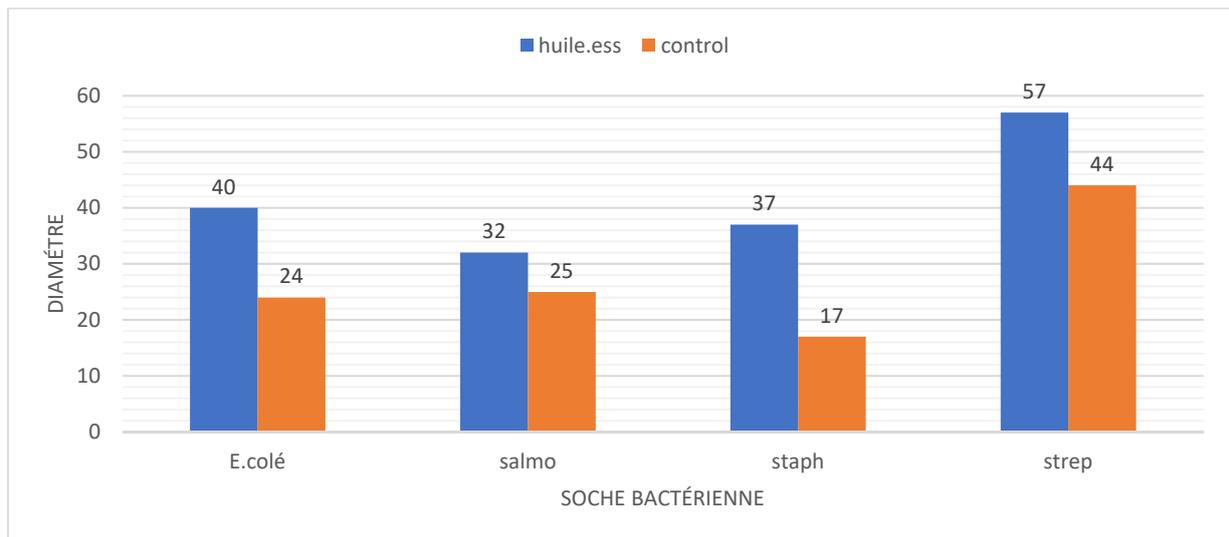


Figure 19 : Comparaison entre l'effet antibactérienne de l'huile essentielle et les Différents antibiotiques.

D'après le tableau 10 on constate que le diamètre de la zone d'inhibition diminue en fonction des différentes concentrations ce qui montre que le pouvoir antibactérienne est inversement proportionnelle de la dilution (l'effet diminue avec l'augmentation de la dilution de l'huile)

Les quatre souches bactériennes sont très sensibles à l'essence de *Thymus Capitatus* (CMI < 30 µg/ml)

La souche la plus sensible est *Streptocoque*, elle est inhibée par une concentration minimale de (7.36) µg/ml.

Suite à cette résultat, l'huile essentielle est jugée modérément active contre les souches *Salmonella* et *Escherichia coli* pour une concentration minimale inhibitrice de (14.72) µg/ml.

Staphylococcus est inhibée par une concentration minimale de (29.44) µg/ml.

Tableau 10 : Effet de la dilution de l'huile de *Thymus Capitatus* sur les quatre souches.

	1	1/2 v/v	1/4 v/v	1/8 v/v	1/16 v/v	1/32 v/v	1/64 v/v	1/128 v/v
<i>E.colé</i>	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
<i>Salmonella</i>	+++	+++	+++	++	+	+	-	-
<i>Streptocoque</i>	+++	+++	++	++	++	+	+	-
<i>Staphylocoque</i>	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

En comparant les données précédentes avec la composition chimique de l'huile, il devient évident qu'il existe une relation entre la forte activité des huiles de type *Thymus* et la présence des composants phénoliques, tel que le Thymol et le Carvacrol. La forte activité antimicrobienne de cette huile s'expliquer par le pourcentage élevé de composants phénoliques. Il semble possible que des composants phénoliques puissent interférer avec les enzymes de la paroi cellulaire [82].

Par conséquent, la teneur élevée en composants phénoliques peut expliquer la fort activité antibactérienne de l'huile [83].

D'après nos résultats, il est évident que l'huile essentielle d'espace étudiée ainsi que le monoterpène phénolique le Carvacrol et le Thymol ont une activité antibactérienne très élevée en comparant avec les antibiotiques commerciaux *Chloramphénicol*, *Cefoxitin*, *Gentamycine*, ces résultats pourraient être liés au pourcentage élèves de composés phénoliques, tel que le Carvacrol et le thymol [84-86] .

VI.5.2. Activité antifongique :

L'activité antifongique est témoignée par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne. L'utilisation des témoins pour objectif d'une comparaison juste et fiable de l'effet de l'huile essentielle contre les souches fongiques utilisées. Voir l'Annex 05

Les résultats des diamètres de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Thymus Capitatus* sont indiqués dans la figure 20.

La figure ci-dessous représente la croissance mycélienne des souches en fonction de la concentration de l'huile essentielle de *Thymus Capitatus*.

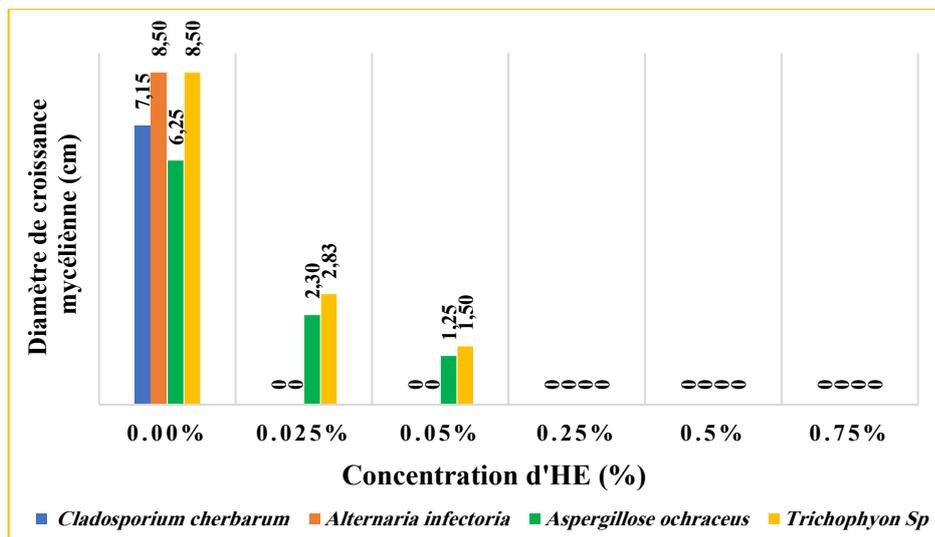


Figure 20 : Effet de *Thymus Capitatus* sur les souches fongiques

L'effet du *Thymus Capitatus* sur la croissance mycélienne a été enregistré à la concentration qui correspond à l'absence d'huile essentielle (témoin) avec un diamètre de croissance de (7.15cm, 8.50cm, 6.25cm et 8.50cm) pour *Cladosporium herbarum*, *Alternaria infectoria*, *Aspergillose ochraceus* et *Trichophyton Sp* respectivement.

Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne est très importante pour le témoin (0 %), on remarque une diminution remarquable de la croissance mycélienne avec l'augmentation de la concentration pour les souches *Trichophyton Sp* et *Aspergillose ochraceus*, par contre pour les

concentrations 0.25 µl/ml ,0.5 µl/ml et 7.5 µl/ml aucune croissance observée pour toutes les souches testées (inhibition totale pour toutes les souches fongiques). Les souches *Cladosporium herbarum* et *Alternaria infectoria* sont les plus sensibles qui ne nous remarquons aucune croissance pour les deux même à faible concentration (inhibition totale pour toutes les concentrions).

VI.5.2.1. La cinétique de la croissance mycélienne :

Le graphe ci-dessous résume les résultats de la croissance mycélienne (cm) des souches fongiques en fonction du temps d'incubation et de la concentration de l'HE de *Thymus Capitatus*.

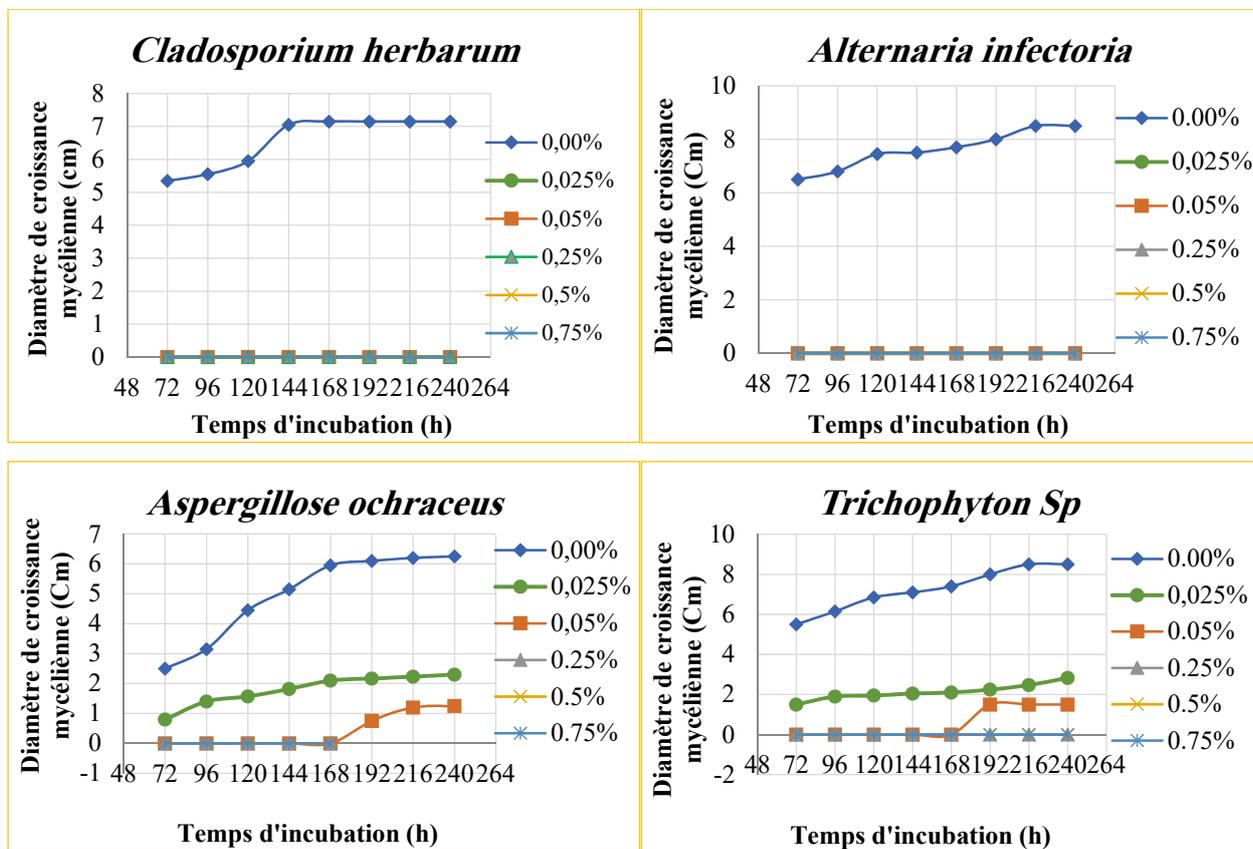


Figure 21 : Cinétique de croissance mycélienne en fonction de temps et concentration des huiles essentielles de *Thymus Capitatus*.

La figure21 représente la cinétique de croissance mycélienne en fonction de temps et de la concentration de l'huile essentielle étudiée, on remarque qu'il y a une forte diminution de la croissance mycélienne avec le temps d'incubation pour les souches *Aspergillose ochraceus* et *Trichophyton Sp* aux

concentration 0.25µl/ml après 72 heure au- delà de cette concentration on n’observe aucune croissance, par contre pour la concentration 0.5 µl/ml on remarque une présence de croissance mycélienne après 168 heur d’incubation. .

Les deux souches *Cladosporium herbarum* et *Alternaria infectoria* sont les plus sensibles où aucune croissance n’a été enregistrée pour toutes les concentrations de 0.25 µl/ml à 7.5 µl/ml (de 0.025% à 0.75%) pendant tous les jours d’incubation.

Nous n’observons aucune croissance mycélienne de toute souches fongiques pour les concentrations 2.5 µl/ml, 5 µl/ml,7.5 µl/ml.

VI.5.2.2. Indice antifongique :

Le figure 22 montre que les concentrations 0.25%, 0.5%,0.75% de notre huile essentielle ont empêché totalement la croissance des souches fongiques testées.

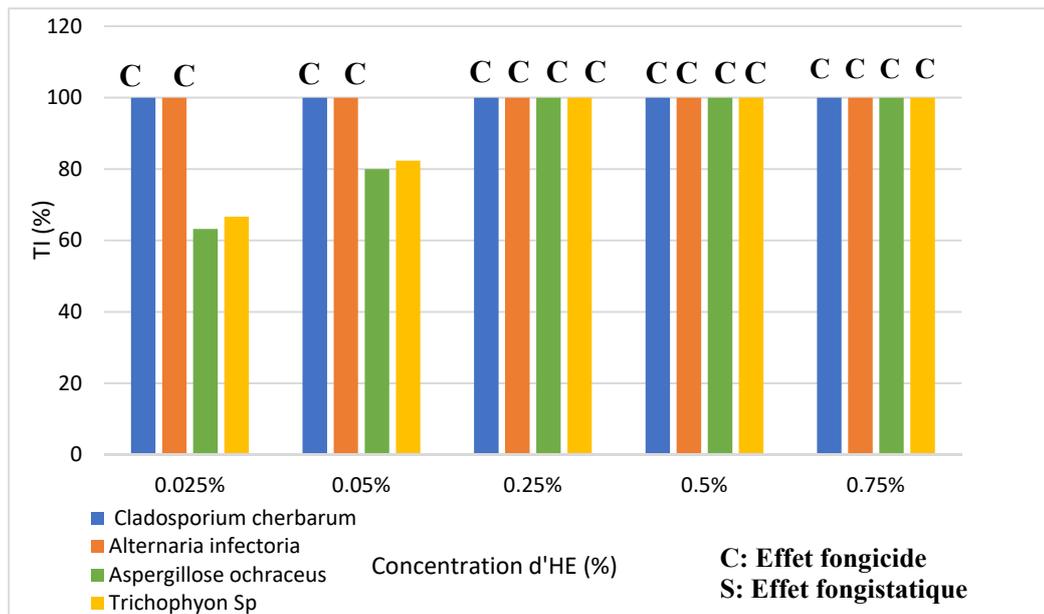


Figure 22: Taux d’inhibition des souches en fonction de la concentration

Selon la figure 22 on remarque que le taux d’inhibition a un effet fongicide contre les souches *Cladosporium herbarum* et *Alternaria infectoria*, et un effet fungistatique contre les souches d’*Aspergillose ochraceus* et *Trichophyton Sp*. En effet la CMI est de 0.5 µl/ml (0.05%) pour les souches

d'*Aspergillose ochraceus* et *Trichophyton Sp*, pour les souches *Cladosporium herbarum* et *Alternaria infectoria* on estime que le CMI est inférieur à 0.125 µl/ml (0.0125%).

VI.5.2.3. Vitesse de la croissance mycélienne :

La figure 23 Montre la vitesse mycélienne des quatre souches fongiques en fonction de la concentration de l'huile essentielle :

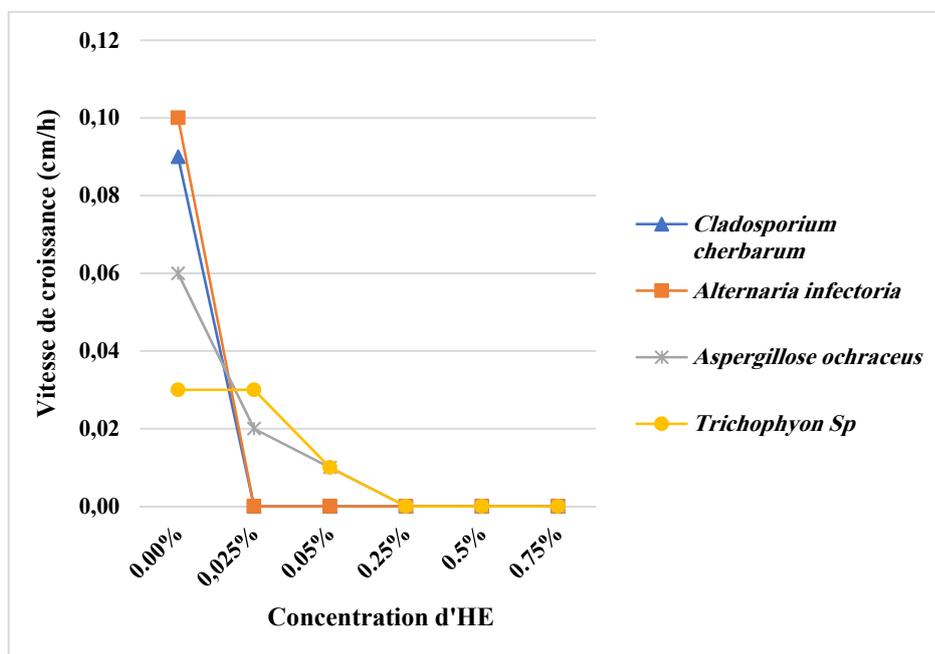


Figure 23: Vitesse de la croissance mycélienne sous l'effet de l'augmentation de la concentration d'huile essentielle de *Thymus Capitatus*.

D'après la figure 23, on observe une diminution remarquable de la vitesse de la croissance mycélienne par l'augmentation de la concentration de l'HE, elle diminue jusqu'à l'inhibition totale (0 cm/h) dans la dose 0.025% pour *Cladosporium herbarum* et *Alternaria infectoria*, et 0.25% pour *Aspergillose ochraceus* et *Trichophyton Sp*.

La technique de contacte directe consiste à mettre en contact l'huile essentielle et les micro-organismes, puis observer la croissance de ces derniers.

L'huile essentielle de *Thymus Capitatus* a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des souches testées. Les diamètres, la vitesse et l'indice antifongique de la croissance de mycélium diminuent à chaque fois qu'on augmente la concentration des huiles essentielles jusqu'à la non germination du disque au CMI déterminée, cela confirmé par les travaux de Mehani et ces collaborateurs [87].

La complexité de la composition chimique des huiles essentielles avec une dizaine de composés rend le processus d'identification du composant responsable de l'activité antimicrobienne très difficile. Souvent, l'activité antimicrobienne résulte de la synergie ou de l'antagonisme entre plusieurs composants, même Daferera et al. (2003) ont postulé que l'activité antifongique des huiles essentielles est principalement attribuable à leurs composants principaux, bien que la possibilité d'autres phénomènes, tels que la synergie ou l'antagonisme avec des composants mineurs [19].

Beaucoup de travaux ont souligné l'efficacité antifongique des phénols terpéniques et plus particulièrement celle du thymol et/ou du Carvacrol. Ces deux molécules possèdent un très large spectre d'activité antimicrobienne et ils sont naturellement présents dans les essences de la plupart des espèces de thym et d'origan [88].

Le mécanisme de la toxicité phénolique sur les champignons est fondé principalement sur l'inhibition des enzymes fongiques contenant le groupement SH dans leur site actif [89].

Tabti et al. (2014) ont rapporté que les hydrocarbures terpéniques et les composés phénoliques présents dans l'HE de thymus étaient responsables des effets observés chez 14 microorganismes responsables de la détérioration des aliments et des souches fongiques telles que *Aspergillus niger*, *A. flavus* et *Fusarium oxysporum*[90].

La classe de phénols des huiles essentielles cause davantage de dommages tels que les perturbations morphologiques des hyphes mycéliens, la perturbation du plasma membranaire et l'altération de la structure des mitochondries [89].

Après une étude menée par Miri, Y.B. et D. Djenane qui montre clairement que l'huile essentielle de *Thymus Capitatus* algérien peut inhiber la croissance d'*Aspergillus flavus* E73 et la production d'AFB1. En outre, ils présentaient un large spectre fongitoxique contre certaines moisissures d'origine alimentaire ; les souches testées sont : *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus*

niger, *Aspergillus ochracus*, *Aspergillus tamari*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* et *Rhizopus sp* [78].

En effet, Arras et Usai (2001) ont constaté que l'huile essentielle de *Thymus Capitatus* présentait une forte activité fongicide contre *Alternaria citri*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum* et *Botrytis cinerea* [89].

Cette importante bioactivité de l'huile essentielle de *Thymus Capitatus* contre les souches fongiques pathogènes testées est en relation avec leur teneur élevée en composés phénoliques (Thymol et Carvacrol) et l'effet synergique entre les différents composés mineurs de cette huile essentielle.

Conclusion

Conclusion

Dans le but d'élaborer de nouveaux agents naturels antibactériens, antifongiques, l'huile essentielle de plante médicinale de la flore Algérienne, *Thymus Capitatus*. Ont fait l'objet d'une étude phytochimique. Différentes analyses sont appliquées à cette plante : extraction de l'huiles Essentielle, analyse de l'essence par la GC/MS, la détermination de leur pouvoir antibactérien in vitro sur des souches pathogènes et multirésistantes : il s'agit de *Escherichia coli*, *salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptocoque* et en fin le test de leurs pouvoir antifongique sur quatre champignons : *Cladosporium cherbarum*, *Alternaria infectoria*, *Trichophyon Sp*, *Aspergillose ochraceus*.

L'extraction de l'huile essentielle par l'hydrodistillation a montré un rendement en huile de 1.56%. L'analyse qualitative et quantitative est réalisée par GC/MS, a permis d'identifier vingt-deux composés qui représentent environ 98.21% d'essence totale. L'huile essentielle de thymus capitatus de l'ouest d'Algérie est dominée par le Thymol 51.22%, suivi du Carvacrol 12.59% et du Gamma. - Terpinène 10.3%.

L'activité antibactérienne évaluée par les tests in vitro, ressort que les huiles essentielles possédant un fort pouvoir antibactérienne sur les souches testées. Toutefois, l'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espace bactérienne, la souche la plus sensible est *Streptocoque* par rapport aux autres souches avec une zone d'inhibition de 57 mm de diamètre.

L'étude de l'activité antifongique a été démontrer par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne par la technique de contact directe sur quatre souches fongiques pour une gamme de concentration de 0.25 à 7.5 µl/ml. L'huile essentielle a une importante activité inhibitrice vis-à-vis des souches testées, les souches les plus sensibles sont *Cladosporium herbarum* et *Alternaria infectoria*. Les diamètres, la vitesse et l'indice antifongique de la croissance mycélienne diminue à chaque fois qu'on augmente la concentration en l'huile essentielle. Les essais ont donné des inhibitions satisfaisantes par rapport aux témoins pour des faibles concentrations avec une activité fongicide sur les souches *Cladosporium herbarum* et *Alternaria infectoria*.

Ces forts pouvoirs bioactifs remarquables chez l'huile essentielle de *Thymus Capitatus* est attribué principalement à leur teneur important en phénols terpéniques (Thymol et Carvacrol)

CONCLUSION

Ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances de source naturelle active biologiquement d'une plante locale a des propriétés médicinales et aromatiques, la grande activité inhibitrice de l'huile essentielle étudiée sur la croissance bactérienne et fongique laisse entrevoir des perspectives d'application dans plusieurs domaines industriels : pharmaceutique, cosmétique, alimentaire, etc.

Bibliographie

Référence :

1. Mamadou, R.S., et al., *Etude phytochimique, activités antiradicalaire, antibactérienne et antifongique d'extraits de Sebastiania chamaelea (L.) Müll. Arg.* Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie, 2014. **37**: p. 10-17.
2. Yawo, M.K., *Caractérisation chimique des huiles essentielles de différentes provenances de Thymus satureioides C. & B. dans le Sud-Ouest Marocain et évaluation de leur potentiel bio-insecticide contre Varroa destructor Anderson & Trueman (Arachnida: Acari: Varroidae) dans le Gharb .2014.Thèse de Doctorat ,Ecole Nationale ForestIre* .
3. Bereksi Reguig, Y.L., *Interactions entre l'huile essentielle de Thymus capitatus, Mentha piperita et Carthamus caeruleus, et de leur composants majoritaires: Effet du synergisme ou d'antagonisme sur l'activité antioxydante.* 04/01/2017.Mémoire de Master, université de Tlemcen .
4. bilal, G.m., *Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques.* 2015-2016, Thèse de doctorat.unversité de Ouargla.
5. TEHAMI, W., *Caractérisation phytochimique et évaluation du potentiel antioxydant, antimicrobien et anti-inflammatoire de Salvia argentea.* 2017.thèse de doctorat .université de Sidi bel abbas .
6. Figueredo, G., *Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne.* 2007,Thèse de doctorat Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
7. Imène, L., *Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de Lavandula officinalis.*Revue de Nature & Technolgie . 2015.
8. Benayache, F., *Etude phytochimique et biologique de l'espèce Thymus numidicus Poiret.*2013.mémoire magister universite constantine I.
9. El Ajjouri, M., et al., *Activité antifongique des huiles essentielles de Thymus bleicherianus Pomel et Thymus capitatus (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre.*journal of Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 2008. **12**(4): p. 345-351.
10. Wafaa, R. and K. Zeyneb, *Initiation à l'Elaboration d'une carte de répartition du genre Thymus et l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de Thymus Serpyllum L. récoltée du*

- massif Dahra Zaccar région d'El Amra-wilaya de Ain Defla*. 2017. Mémoire de Master , université de khims miliana .
11. Chaima, A.I.D. and Z. Ghania, *Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis L. et du Thymus capitatus L. sur des agents d'otomycose: Cas d'Aspergillus niger*. 2018. mémoire de master . université de guelma .
 12. Quezel, P., S. Santa, and O. Schotter, *Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desertiques meridionales-v. 1-2*. 1962.
 13. <https://www.naturalmedicinesfacts.info/plant/thymus-capitatus.html> .
 14. Cowan, M.M., *Plant products as antimicrobial agents*. Clinical microbiology reviews, 1999. **12**(4): p. 564-582.
 15. Takeuchi, H., Z.-G. Lu, and T. Fujita, *New monoterpene glucoside from the aerial parts of thyme (Thymus vulgaris L.)*. journal of Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2004. **68**(5): p. 1131-1134.
 16. Remaci, D., *Effets antimicrobiens de l'extrait à l'hexane aqueux de Thymus vulgaris (Thym) récolté dans la région de Naama sur la croissance des germes lactiques: Streptococcus thermophilus et Lactobacillus bulgaricus*. 2017.mémoire de master , université de mostaganem .
 17. YAHIA, B. and N.B.A. SAMIRA, *Activités antimicrobiennes et insecticides de Thymus capitatus, Daucus crinitus et Tetraclinis articulata sur la mineuse Tuta absoluta (Meyrick) et la microflore pathogène de la tomate Lycopersicum esculentum*. 2015.Thèse de doctorat.université de Telmcen .
 18. Usai, M., et al., *Comparison of antibacterial activity of natural and hydroformylated essential oil of Thymus capitatus growing wild in north Sardinia with commercial Thymus essential oils*. Journal of Natural product communications, 2010. **5**(12): p. 1934578X1000501233.
 19. Russo, M., et al., *Essential oil chemical composition and antifungal effects on Sclerotium cepivorum of Thymus capitatus wild populations from Calabria, southern Italy*. Journal Revista Brasileira de Farmacognosia, 2013. **23**(2): p. 239-248.
 20. Casiglia, S., et al., *Influence of harvesting time on composition of the essential oil of Thymus capitatus (L.) Hoffmanns. & Link. growing wild in northern Sicily and its activity on microorganisms affecting historical art crafts*. Arabian Journal of Chemistry, 2015.

21. El Ouadi, Y., et al., *The use of essential oil of Thymus capitatus originating from North-East Morocco, as eco-friendly Corrosion inhibitors of mild steel in hydrochloric acid solution.* International Journal of Development Research, 2016. **6**(2): p. 6867-6874.
22. AINANE, A., et al., *Composition chimique et activité anti insecticide des huiles essentielles de Thymus du Maroc: Thymus Capitatus, Thymus Bleicherianus et Thymus Satureioides.* 2018. *journal of proceedings biosune* .
23. Aissaoui, A.B., et al., *Activité Acaricide Des Huiles Essentielles Du Mentha Pulegium, Origanum Compactum Et Thymus Capitatus Sur L'acarien Phytophage Tetranychus Urticae Koch (Acari: Tetranychidae).* European Scientific Journal, ESJ, 2018. **14**(3): p. 118.
24. Bounatirou, S., et al., *Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian Thymus capitatus Hoff. et Link.* journal of Food chemistry, 2007. **105**(1): p. 146-155.
25. Akrou, A., *Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie).* journal de Cahiers Options Méditerranéennes, 2004. **62**: p. 289-292.
26. Akrou, A., et al., *Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of Artemisia campestris L., Artemisia herba alba Asso, & Thymus capitatus Hoff. et Link. growing wild in the Southern of Tunisia.* journal de Recent Research in Science and Technology, 2010. **2**(1).
27. Mkaddem, M.G., et al., *Essential oil of Thymus capitatus Hoff. et Link. from Matmata, Tunisia: gas chromatography-mass spectrometry analysis and antimicrobial and antioxidant activities.* Journal of medicinal food, 2010. **13**(6): p. 1500-1504.
28. Moujahed, N., et al., *Nutritive value and essential oils characterization of Rosmarinus officinalis and Thymus capitatus from the central region of Tunisia.* Challenging Strategies to Promote the Sheep and Goat Sector in the Current Global Context (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens No. 99). Ranilla MJ, Carro, MD, Ben Salem, H., and Morand-Fehr P.(Eds). Zaragoza, Spain: CIHEAM-IAMZ/CSIC/Universidad de León/FAO, 2011: p. 245-249.
29. Hosni, K., et al., *Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (Thymus capitatus L.) and rosemary (Rosmarinus officinalis L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity.* journal Industrial Crops and Products, 2013. **47**: p. 291-299.

30. Džamić, A.M., et al., *Libyan Thymus capitatus essential oil: antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and colon pathogen adhesion-inhibition properties*. Journal of applied microbiology, 2015. **119**(2): p. 389-399.
31. Bouchekrit, M., *ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE ET DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE DEUX APIACEAE Elaeoselinum asclepium (L.) Bertol. et Margotia gummifera (Desf.) Lange*. 2018.Thèse de doctorat .université de sètif .
32. Tabti, M. and F.Z. Sali, *contribution a l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Érica multiflorad'Algérie*. 2016.Mémoire de Master . Université de mostaganem.
33. BOUCHIKHI TANI, Z., *Lutte contre la bruche du haricot Acanthoscelides obtectus (Coleoptera, Bruchidae) et la mite Tineola bisselliella (Lepidoptera, Tineidae) par des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles*.2011.Thèse de doctorat .université de Telmcene.
34. Mayer, F., *Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles: étude de cas en maison de retraite*. 2012.mémoire de master, Université de Lorraine.
35. Amarti, F., et al., *Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Thymus algeriensis Boiss. & Reut. et Thymus ciliatus (Desf.) Benth. du Maroc*.Journal of Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 2010. **14**(1): p. 141-148.
36. Bakkali, F., et al., *Biological effects of essential oils—a review*. Food and chemical toxicology, 2008. **46**(2): p. 446-475.
37. Saad, B. and O. Said, *Greco-Arab and Islamic herbal medicine: traditional system, ethics, safety, efficacy, and regulatory issues*. 2011: John Wiley & Sons.
38. BENOMARI, F.Z., *VARIABILITE CHIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DES VOLATILS DES ESPECES AROMATIQUES A INTERET ECONOMIQUE DES GENRES MENTHA, INULA, THYMUS, ASTERICUS ET CHRYSANTHEMUM DE L'OUEST ALGERIEN*. 16-05-2018.Thèse de doctorat .Universite de Telemcen .
39. Ozcan, B., et al., *Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of Laurus nobilis seed oil*. Journal of Environmental Biology, 2010. **31**(5): p. 637-641.
40. Bona, E., et al., *Sensitivity of Candida albicans to essential oils: are they an alternative to antifungal agents?* Journal of applied microbiology, 2016. **121**(6): p. 1530-1545.
41. Benabderrahmane, M., et al., *Activité antimicrobienne des huiles essentielles de Pistacia atlantica Desf. de l'Algérie*. Phytothérapie, 2009. **7**(6): p. 304-308.

42. BESSEDIK, Z. and B. BAHRI, *Evaluation de L'effet insecticide de l'extrait méthanoïque et les huiles essentielles des feuilles de Calamintha nepeta vis-à-vis des puceronsdes agrumes*. 2018.Mémoire de Master.Université de mostaganem.
43. Bruneton, J., *Pharmacognosie: Phytochimie*. Plantes médicinales, 1999. **2**.
44. Piochon, M., *Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse*. 2008: Université du Québec à Chicoutimi.
45. Baser, K.H.C. and G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. 2015: CRC press.
46. Lahlou, M., *Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 2004. **18**(6): p. 435-448.
47. Courvalin, P., et al., *Bactericide, Aspects théoriques et thérapeutiques*. 1990: p. 110.
48. Sacchetti, G., et al., *Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods*. Journal of Food chemistry, 2005. **91**(4): p. 621-632.
49. de Souza, E.L., et al., *Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation*. Rev. Bras. Farm, 2006. **87**(1): p. 22-25.
50. Guinoiseau, E., *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action*. 2010,Thèse de doctorat . Université de Corse.
51. Guinoiseau, E., *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action*. 2010, Université de Corse.
52. Wendakoon, C.N. and M. Sakaguchi, *Inhibition of amino acid decarboxylase activity of Enterobacter aerogenes by active components in spices*. Journal of Food Protection, 1995. **58**(3): p. 280-283.
53. Tsuchiya, H., et al., *Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal of ethnopharmacology, 1996. **50**(1): p. 27-34.
54. Hammer, K.A., C. Carson, and T. Riley, *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. Journal of applied microbiology, 1999. **86**(6): p. 985-990.

55. Daroui-Mokaddem H., *Etude phytochimique et biologique des especes : Eucalyptus globulus (Myrtaceae), Smyrnum olusatrum (Apiaceae), Asteriscus maritimus et Chrysanthemum trifurcatum(Asterarceae)*. 2011.Thèse de doctorat, Université Badji-Mokhtar, Annaba
56. Burt, S., *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review*. International journal of food microbiology, 2004. **94**(3): p. 223-253.
57. Lis-Balchin, M., *Lavender: the genus Lavandula*. 2003: CRC press.
58. Karaman, S., et al., *Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of Thymus revolutus Celak from Turkey*. Journal of Ethnopharmacology, 2001. **76**(2): p. 183-186.
59. Duarte, M.C.T., et al., *Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants*. Journal of ethnopharmacology, 2005. **97**(2): p. 305-311.
60. Cox, S., et al., *The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil)*. Journal of applied microbiology, 2000. **88**(1): p. 170-175.
61. Knobloch, K., et al., *Antibacterial and antifungal properties of essential oil components*. Journal of Essential Oil Research, 1989. **1**(3): p. 119-128.
62. Lucchesi, M.-E., *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles*. 2005.Thèse de doctorat, Université de la Réunion.
63. Bassereau, M., et al., *GC-MS quantification of suspected volatile allergens in fragrances. 2. Data treatment strategies and method performances*. Journal of agricultural and food chemistry, 2007. **55**(1): p. 25-31.
64. Belaiche, P., *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie: Les maladies infectieuses*. 1979: Maloine.
65. Lamamra, M., *Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de tinguarra sicula (L.) Parl et de Filipendula hexapetala Gibb*. 2018.Mémoire magister . Université de sètif .
66. de Souza, A.T., et al., *Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (Eremanthus erythropappus) oil using supercritical carbon dioxide*. The Journal of Supercritical Fluids, 2008. **47**(2): p. 182-187.
67. Lagunez Rivera, L., *Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe*. 2006.thèse de docterat . Laboratoire de Chimie Agro - Industrielle.Toulouse.

68. Lamamra, M., *Activités biologiques et composition chimique des huiles essentielles d'Ammiopsis aristidis Coss. (Syn. Daucus aristidis Coss.) et d'Achillea santolinoides Lag.* 2018. Thèse de doctorat. Université de Sétif.
69. AFNOR, *Huiles essentielles. Échantillonnage et méthodes d'analyse Monographies relatives aux huiles essentielles.* Tome 2 ed. 2000.
70. LA, M.J.-, Y. LOUKOU, and F. GUEDE-GUINA, *Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de Morinda morindoides (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'Escherichia coli* *Study of the antibacterial activity of Morinda morindoides (Baker) milne-redheat (rubiaceae) acetatigue extract (ACE) on in-vitro growth of Escherichia coli strains.* Journal Bulletin de la société royale des sciences de Liège, 2008.
71. Aouni, M., F. Pelen, and R. Soulimani, *Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application.* Phytothérapie, 2013. **11**(4): p. 225-236.
72. Moreira, M., et al., *Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen.* Journal LWT-Food Science and Technology, 2005. **38**(5): p. 565-570.
73. Ponce, A., et al., *Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard.* Journal LWT-Food Science and Technology, 2003. **36**(7): p. 679-684.
74. Mohammedi, Z. and F. Atik, *Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de Lavandula stoechas L.* Revue «Nature & Technologie». n, 2012: p. 35.
75. Chang, S.-T., et al., *Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwania (Taiwania cryptomerioides Hayata) heartwood.* Holzforschung, 1999. **53**(5): p. 487-490.
76. Goudjil, M., et al., *Bioactivity of Laurus Nobilis and Mentha Piperita essential oils on some phytopathogenic fungi (in vitro assay).* Journal. Mater. Environ. Sci, 2016. **7**: p. 4525-4533.
77. Amarti, F., et al., *Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Thymus capitatus et de Thymus bleicherianus du Maroc.* Journal Phytothérapie, 2008. **6**(6): p. 342.
78. Miri, Y.B. and D. Djenane, *Antifungal, Anti-aflatoxigenic, Antioxidant Activity and in vivo Efficacy of Essential Oil of the Aerial Parts of Thymus capitatus (L.) Hoffmanns & Link.* journal Phytothérapie, 2018.

79. Shiyab, S., et al., *Influence of developmental stage on yield and composition of Origanum syriacum L. oil by multivariate analysis*. Journal of Medicinal Plants Research, 2012. **6**(15): p. 2985-2994.
80. Giweli, A., et al., *Allelopathic Effects on Seeds Germination of Lactuca Sativa L. Seeds and Antibacterial Activity of Thymus Capitatus Essential Oil from Zintan-Libya flora*. American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS), 2016. **17**(1): p. 121-131.
81. Martínez, K., et al., *The Effect of Edible Chitosan Coatings Incorporated with Thymus capitatus Essential Oil on the Shelf-Life of Strawberry (Fragaria x ananassa) during Cold Storage*. Biomolecules, 2018. **8**(4): p. 155.
82. Adams, S., B. Kunz, and M. Weidenböner, *Mycelial deformations of Cladosporium herbarum due to the application of eugenol or carvacrol*. Journal of Essential Oil Research, 1996. **8**(5): p. 535-540.
83. Adam, K., et al., *Antifungal activities of Origanum vulgare subsp. hirtum, Mentha spicata, Lavandula angustifolia, and Salvia fruticosa essential oils against human pathogenic fungi*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(5): p. 1739-1745.
84. Giordani, R., Y. Hadeif, and J. Kaloustian, *Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants*. Journal Fitoterapia, 2008. **79**(3): p. 199-203.
85. Soković, M., et al., *Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece*. Food/Nahrung, 2002. **46**(5): p. 317-320.
86. Blois, M.S., *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*. Journal of Nature, 1958. **181**(4617): p. 1199.
87. Mehani, M., et al., *Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oil of Eucalyptus camendulensis on a Few Bacteria and Fungi*. World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 2014. **8**(8): p. 937-940.
88. Rajae, E.B. and P.B. Meryem, journal *GESTION ET CONSERVATION DE LA BIODIVERSITE*.
89. Arras, G. and M. Usai, *Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of Thymus capitatus oil and its effect in subatmospheric pressure conditions*. Journal of Food Protection, 2001. **64**(7): p. 1025-1029.

REFERENCE

90. Farag, R., et al., *Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils*. Journal of food protection, 1989. **52**(9): p. 665-667.

ANNAXE

Annexe

Annexe 1 : Montage d'extraction de l'huile essentielle



Extraction par Hydrodistillation (type Clavenger)

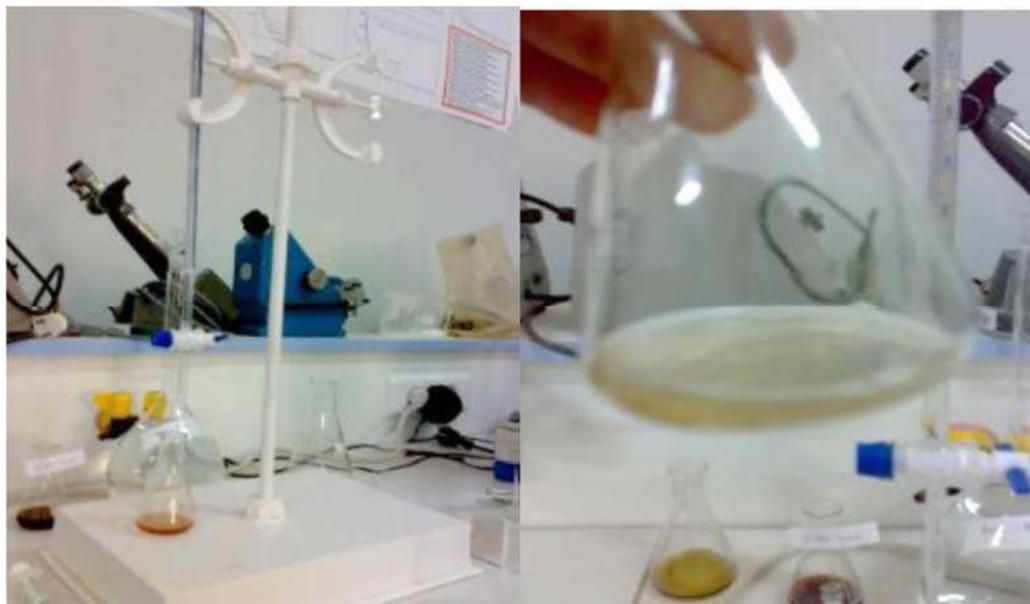
Annex 2 : Appareillages des analyse physique-chimique.



pH-mètre



Réfractomètre



Dispositif de mesure d'indice d'acide



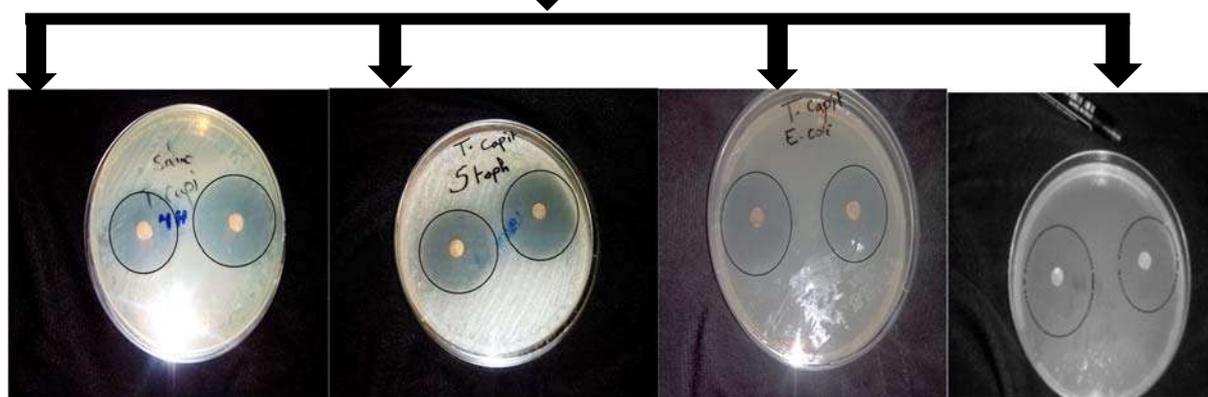
Densimètre

Annexe 3 :Analyse par GC/MS



Bruker SCION 436 GC, couplé avec un spectromètre de masse type Bruker SCION 436 GC

Annexe 4 : Activité antibactérienne



Détermination de concentration minimal inhibitrice



Annex 5 : Activité antifongique.

