

Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Evaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne
des huiles essentielles de deux plantes médicinales
locales : *Thymus munbyanus* Bioss. & Reut. & et
Rosmarinus officinalis L.**

Présenté par :

SAADI Fazia & ADJIR Hanane

Soutenu le : **25 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M^{me} LEHOUCHE R.

MCB

Présidente

M^r CHIKHOUNE A.

MCA

Encadreur

M^{me} TAMANDJARI S.

MCB

Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Dieu le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail

Nos remerciements vont à notre promoteur Mr CHIKOUNE.A pour son accueil, ses conseils toujours pertinents, et sa mise à notre disposition

Nos remerciements les plus sincères s'adressent également à Mme LEHOUCHE.R D'avoir accepté de présider le jury, ainsi que Mme TAMANDJARI.S de nous savoir fait l'honneur d'examiner notre travail

Un grand merci pour Mr ADJEBLI A. pour son aide

Nous remercions aussi le personnel du laboratoire de Microbiologie Alimentaire

Finalement, on est profondément reconnaissantes à toute personne qui nous a idées de près ou de loin, durant ce passage

Fazia et Hanane

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de mes efforts

A ceux que j'aime le plus au monde mes très chers parents, luiza et Hamid

leurs sacrifices et leurs encouragements pendant toute ma vie, je

Ne saurais jamais comment exprimer mes sentiments pour avoir

Veillé sur mon éducation, jamais je ne peux les remercier

Assez de m'avoir donné le meilleur.

A mes chères sœurs Nadia et son mari Rabah ainsi Rosa

A mon cher et unique frère Lahcen

A mes chères grandes mères Zineb et Fatma que Dieu l'es garde

A ma binôme Hanane et sa famille

A mon futur mari Ahmed et sa famille, les deux petits Halima et Arezki que j'adoore

A mes chères coupines : Hayet, Melissa, Zouzou, Fariel, Souad et Sabrina

A tous mes amis et tous qui me connaisse je vous aime

Et surtout les familles Saadi, Rahmoune, Amrane et Arabe

A toute la promotion Master II Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire 2018

Fazia

Dédicaces

*A laide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pue réaliser ce
modeste travail que je dédie :*

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

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

A la mémoire de ma grand-mère que son âme repose en paix

A mon cher et unique frère : Mohand Arezki

A mes très chères sœurs : Lamia, Tinhinane

*A mon mari qui ma beaucoup soutenus, qui est toujours à mes cotés et que j'aime
énormément : Amirouche*

A toutes ma belle famille

A mes chères amies avec lesquels j'ai partagé des moments

Inoubliables : Fatima, Warda

A ma binôme Fazia, ainsi qu'à toute sa famille

A toute la promotion Master II Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire 2018

A ceux que j'aime et qui ont été toujours présent pour moi.

Hanane

Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des abréviations

Introduction.....01

I : Les huiles essentielles

I.1 Définitions.....03
I.2 Localisation des huiles essentielles.....03
I.3 Composition chimique.....03
I.4 Propriétés physico-chimiques des HE03
I.5 Domaines d'utilisation des huiles essentielles04
I.6 Toxicité des huiles essentielles04
I.7 Conservation des huiles essentielle.....05
I.8 Association d'huiles essentielles.....05
I.9 Les techniques d'extraction des huiles essentielle.....05

II. Monographie des plantes étudiées

II.1 Thym.....07
II.1.1 Caractéristiques botaniques.....07
II.1.2 Classification.....07
II.1.3 Description morphologique07
II.1.4 Localisation et répartition géographique.....08
II.1.4.1 Dans le monde08
II.1.4.2 En Algérie08
II.1.5 Huile essentielle du thym.....09
II.1.6 Principales utilisations du thym.....09
II.2 Romarin.....10
II.2.1 Description morphologique10
II.2.2 Classification10
II.2.3 Localisation et répartition géographique.....10
II.2.4 Huiles essentielle du romarin.....11
II.2.5 Principales utilisation du romarin.....11

III. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE

III.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE.....12
III.1.1 Principales méthodes.....12
III.1.1.1 Techniques par contact direct12
III.1.1.2 Microatmosphère13
III.2.1 Propriétés antibactériennes.....14
III.3.2 Propriétés antifongiques14

IV. Matériel et méthodes

| | |
|--|----|
| IV.1 Matériel végétal | 15 |
| IV.1.1 Collecte et séchage..... | 15 |
| IV.2 Extraction des huiles essentielles..... | 16 |
| IV.3 Evaluation de l'activité antibactériennes des huiles essentielles étudiées..... | 17 |
| IV.3.1 Origine et choix des souches bactériennes..... | 17 |
| IV.3.1.1 Préparation de l'inoculum..... | 17 |
| IV.3.1.2 Etude qualitative de l'activité antibactérienne | 18 |
| IV.4 Evaluation de l'activité antifongique..... | 18 |
| IV.4.1 Les souches fongiques testées..... | 18 |
| IV.4.2 Etude qualitative de l'activité antifongique des HE..... | 19 |
| IV.4 Analyse statistique..... | 19 |

V. Résultats et discussions

| | |
|---|-----------|
| V.1 Rendement d'extraction en huile essentielle | 20 |
| V.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles..... | 21 |
| V.2.1 Etude qualitative de l'activité antibactérienne | 21 |
| V.2.2 Evaluation de l'activité antifongique | 24 |
| Conclusion | 28 |

Références bibliographiques

Annexes

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau I: Les techniques d'extraction des huiles essentielles | 06 |
| Tableau II : Principales localisations géographiques du thym en Algérie | 09 |
| Tableau III: Caractéristiques des souches bactériennes testées..... | 17 |
| Tableau IV: Rendement d'extraction en huile essentielle des espèces étudiées..... | 20 |
| Tableau V : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des bactéries testées..... | 21 |

Liste des figures

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Répartition géographique du thym dans le monde | 08 |
| Figure 2 : Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri..... | 13 |
| Figure3 : Illustration de la méthode des microatmosphères | 13 |
| Figure 4 : Photographie de <i>Rosmarinus officinalis</i> | 15 |
| Figure 5 : Photographie de <i>Thymus munbyanus</i> | 15 |
| Figure 6 : Montage d'hydrodistillation de Clevenger modifié | 16 |
| Figure 7 : Schéma simplifié du principe de la méthode des aromatoigrammes | 18 |
| Figure 8 : Zones d'inhibition des HE de <i>Thymus munbyanus</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> et d'oxacilline testées sur les souches phytopatogènes (<i>D. solani</i> , <i>P. atrosepticum</i> , <i>P. carotovorum</i>)..... | 22 |
| Figure 9 : Zones d'inhibition des HE de <i>Thymus munbyanus</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> et d'oxacilline testées sur <i>Escherichia coli</i> | 22 |
| Figure 10 : Zones d'inhibition des HE de <i>Thymus munbyanus</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> et d'oxacilline testées sur <i>Staphylococcus aureus</i> | 23 |
| Figure11 : Taux d'inhibition moyens de croissance mycélienne de <i>B.cinerea</i> (ALG 171) traitée avec l'HEs étudiées | 25 |
| Figure 12 : Taux d'inhibition moyens de croissance mycélienne de <i>B.cinerea</i> (ALG 174) traitée avec l'HEs étudiées | 25 |
| Figure 13 : Taux d'inhibition moyens de croissance mycélienne de <i>B.cinerea</i> (ALG 174) traitée avec l'HEs étudiées | 26 |

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

As.Th.Ros.AK : Association thym /romarin Akbou

As.Th.Ros.AD : Association thym /romarin Adekar

BC : *Botrytis cinerea*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DC : Diamètre moyen de croissance mycélienne du control

DT : Diamètre moyen de croissance mycélienne du traitement

DS : *Dickeya solani*

HE : Huile Essentielle

MH : Mueller Hinton

MHE : Masse d'Huile Essentielle

MS : Matière Sèche

Ms : prise d'essai des matériels végétaux

PDA : Potatos Dextrose Agar

Ros. Ad : *Rosmarinus officinalis* d'Adekar

RHE : Rendement en Huile Essentielle

Th : Thym

UFC : Unité Formant Colonie

Introduction

Introduction

Depuis la plus haute antiquité, les plantes font partie de la vie quotidienne de l'homme, puisqu'il s'en sert pour s'alimenter et se soigner et parfois dans ses traditions superstitieuses et religieuses. Les propriétés odorantes et thérapeutiques des plantes étaient, déjà, connues par l'ancienne Egypte et en Chine (**Fellah *et al.*, 2006**).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 75 à 95% des populations rurales (particulièrement dans les pays en développement) font recours à la médecine traditionnelle faite en grande partie à base de plantes (**OMS, 2003**).

Il a été prouvé qu'environ 20% des espèces végétales poussant dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques ou cosmétiques, car elles contiennent des molécules ou des principes actifs à différentes propriétés biologiques, qui trouvent leur application dans divers domaines (médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture, etc.) (**Suffredini *et al.*, 2004**).

Avec l'apparition des effets secondaires des médicaments synthétiques et l'augmentation de la résistance des microorganismes pathogènes vis-à-vis des antibiotiques classiques, une bonne partie des recherches scientifiques s'orientent actuellement vers la voie de l'usage des extraits biologiques actifs des plantes aromatiques et médicinales, notamment vers les huiles essentielles (**Essawi et Srour, 2000**).

C'est une voie très prometteuse et très efficace pour lutter contre les germes bactériens et même les virus puisqu'elles ne présentent, à long terme, aucune résistance de la part des organismes bactériens (**Saxena, 1997**). La complexité des constituants chimiques des huiles essentielles rend extrêmement difficile aux germes bactériens de développer une résistance.

L'Algérie est comptée parmi les pays du bassin méditerranéen les plus riches en ressources phytogénétiques à intérêt aromatique et médicinal, vu la diversité de ses étages bioclimatiques. On dénombre à plus de 300 espèces à usage thérapeutique ou aromatique existant parmi les 3 150 espèces végétales que compte notre pays (**Mokkadem, 1999**).

Parmi ces plantes aromatiques, notre choix s'est porté sur le thym (*Thymus munbyanus*) et le romarin (*Rosmarinus officinalis*). La première est considérée comme endémique et l'autre est très répandue en méditerranée et particulièrement en Algérie. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier les effets antibactérien et antifongique de ces deux plantes en réalisant des tests *in vitro*.

Introduction

La première partie de cette étude est consacrée à une recherche bibliographique concernant les huiles essentielles, caractérisation des espèces étudiées et enfin l'activité antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles à tester.

La seconde partie du travail est réservée à l'étude expérimentale, dans laquelle nous allons :

- Extraire par hydrodistillation les huiles essentielles de feuilles et les sommités fleuries du *Thymus munbyanus* provenant d'Ouzellaguen et *Rosmarinus officinalis* provenant de deux régions : Akbou et Adekar.
- Evaluer le rendement d'extraction.
- Évaluer l'activité antibactérienne et antifongique des deux huiles essentielles seules ou en association.

Les huiles essentielles

I. Les huiles essentielles

I.1 Définition

L'association française de normalisation (AFNOR) définit une huile essentielle comme étant un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec. L'HE est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (AFNOR, 2000).

I.2 Localisation des huiles essentielles

Parmi les espèces végétales (800 000 à 1500 000 selon les botanistes) 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique par l'intermédiaire de poils, poches ou canaux sécréteurs (Bruneton, 1993). Les genres capables d'élaborer les constituants des HE sont répartis dans un nombre de famille limité ; *Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Astraceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piparaceae, ...* (Bruneton, 1999).

I.3 Composition chimique

Les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant plusieurs centaines de molécules chimiques différentes. Les constituants des HE appartiennent de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les monoterpènes et les sesquiterpènes), et le groupe des composés aromatiques (Bruneton, 1999).

I.4 Propriétés physico-chimiques des HE

Selon Bernard *et al.*, (1988) et Bruneton(1993), les propriétés des huiles essentielles sont :

- ✓ liquides à la température ordinaire ;
- ✓ volatiles et très rarement colorées ;
- ✓ Leur densité est le plus souvent inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0,75 à 0,99 ;
- ✓ Elles sont peu solubles dans l'eau ;
- ✓ solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques ;
- ✓ Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation ;
- ✓ Elles ont un indice de réfraction élevé.

I.5 Domaines d'utilisation des huiles essentielles

❖ Phytothérapie

La phytothérapie est une médecine qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies. En effet, les HE sont largement utilisés pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). Les HE sont utilisées aussi en médecine dentaire (**Schwartz *et al.*, 1992**), les huiles essentielles de thym et de romarin ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires (**Valnet, 1974**).

❖ Parfumerie et cosmétologie

Les huiles essentielles sont utilisées dans les crèmes, les gels à cause de leur activité antiseptique et antioxydante (**Maruzzella, 1962**).

❖ Applications en industrie alimentaire

Les HE possèdent des profils de composition chimique différents, elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**Conner, 1993**).

Elles sont également employées comme agents aromatisants naturels. Selon (**Bruneton, 1993**), la part des HE dans l'aromatisation ne cesse de croître au dépend des composés aromatiques de synthèse.

I.6 Toxicité des huiles essentielles

Selon **Meynadier et Raison-Peyron, 1997** :

- Certaines huiles essentielles peuvent provoquer des réactions cutanées allergiques.
- Les huiles essentielles qui sont utilisées en parfumerie peuvent se comporter en irritant des muqueuses respiratoires et favoriser le déclenchement de crises d'asthme pour les asthmatiques.
- Une ingestion accidentelle d'huile essentielle peut, selon la sorte et la quantité, générer une toxicité élevée voir un coma et même la mort.

I.7 Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances sensibles et très délicates, ce qui rend leur conservation difficile et obligatoire dans le but de limiter les risques de dégradation, ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas conservées dans des flacons opaques à l'abri de la lumière et de la chaleur (Valnet, 2000).

I.8 Association d'huiles essentielles

Les effets antimicrobiens des associations d'huiles essentielles, sont définis selon quatre interactions possibles :

- **Indifférence** : l'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre.
- **Addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque huile essentielle étudié isolément, à la même concentration que dans l'association.
- **Synergie** : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration.
- **Antagonisme** : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle prise séparément.

I.9 Techniques d'extraction des huiles essentielles

Parmi les paramètres qui influencent fortement la composition chimique des huiles, on retrouve la technique d'extraction. Il existe plusieurs techniques d'extraction, les plus importantes peuvent être résumées dans le **tableau I**.

Tableau I : Techniques d'extractions des huiles essentielles

| Technique d'extraction | Principe | Avantages | Inconvénients |
|--|---|---|--|
| Distillation par entraînement à la vapeur d'eau | Faire passer à travers la matière végétale un courant de vapeur d'eau, ces vapeurs saturées en composés organiques volatils sont condensées et récupérées par décantation. Les phénomènes intervenants lors de l'entraînement à la vapeur seraient l'osmose et la diffusion libre (Guenther, 1972). | -Absence de phénomène d'hydrolyse ou de dégradation des molécules aromatiques. -Meilleure récupération des HE entraînée. (Xavier et Chemat, 2012). | Elle exige de la haute température. (Xavier et Chemat, 2012). |
| Hydrodistillation | L'extraction s'effectue dans un appareil de type Clevenger. Le végétal est immergé dans l'eau portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et HE se sépare par différence de densité (Bruneton, 1993). | -Très largement utilisée en parfumerie et cosmétologie. - Utilise des T°C modérées. -La consommation énergétique est réduite. (Xavier et Chemat, 2012). | -L'extraction peut atteindre plusieurs heures. (Xavier et Chemat, 2012). |
| Enfleurage et Macération | -Les fleurs sont mises à macérer dans des graisses et chauffées après étalées sur des châssis en bois pendant plusieurs jours. Une fois gorgés de parfum. - Les corps gras sont filtrés au travers de tissus de lin ou de coton, Les huiles sont ensuite lavées à l'alcool pur, filtrées et évaporées (Bruneton, 1993). | -Très utilisée pour les fleurs extrêmement délicates (le jasmin, la tubéreuse, et les fleurs d'oranger). (Padrini et Lucheroni, 1996). | -Très coûteuse -Durée d'extraction est très longue -Le rendement en HE est faible. (Xavier et Chemat, 2012). |
| Extraction par solvant organique | - Les fleurs sont mises dans un récipient avec le solvant (l'hexane). La solution sera distillée ensuite traitée avec l'alcool pur pour éliminer les impuretés. - Une seconde distillation est faite pour obtenir une essence dite absolue (Chiej, 1982). | -Utilise des températures très faibles. -Le rendement est supérieur. -Utilise surtout pour les plantes fragiles (Henri, 1993). | -Manque de sélectivité - Toxicité de solvant - Résidus de solvant peuvent être présents dans l'HE (Bruneton, 1999). |
| Extraction assistée par micro-ondes | - La plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-onde dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. - L'HE est entraîné dans le mélange isotopique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée. (Bruneton, 1999). | - Très rapide et peu consommateur d'énergie. - Un rendement en HE est élevé (Zlotorynski, 1995). | |
| Extraction par CO₂ Supercritique | -Le végétal est placé dans un extracteur traversé par le flux de CO ₂ supercritique. - Le fluide se charge en composés extraits, puis il est détendu, passe en phase gazeuse et se sépare du composé extrait. ce dernier est recueilli dans un séparateur (Reverchon, 1997). | -CO ₂ abondant. -Peu coûteux, non toxique -Diffusion élevée -Extraction sélective et douce sans dénaturer les molécules sensibles (Mira et al., 1996). | -Investissement pour matériel coûteux -Consommation d'énergie importante (Donelian et al., 2009). |

Monographie des plantes médicinales

II. Monographie des plantes étudiées

II.1 Le Thym

II.1.1 Caractéristiques botaniques

La famille des *Lamiaceae* (*Labiatae*) est l'une des familles botaniques les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antioxydant et antibactérien (**Bouhdid et al., 2006**). Elle regroupe entre 200 et 250 genres et entre 3200 et 6500 espèces (**Anon, 2003 ; Dorman et al., 2004**).

Thymus est l'un des huit genres les plus importants en ce qui concerne le nombre d'espèces chez la famille des *Labiatae*, bien que le nombre d'espèces de ce genre change selon le point de vue taxonomique ; si nous adoptons un caractère synthétique, il comporte plus de 200 espèces (**Morales, 1997**).

II.1.2 Classification

Selon **Baba Aissa (2000)**, le thym appartient au :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe : Magnolipsida

Sous classe : Métachlamydées

Ordre : Tubiflorales

Famille: Lamiacées

Sous famille: Stachyoideae

Genre : *Thymus*

II.1.3 Description morphologique

Le thym est une plante sous-ligneuse érigée ou prostrée, odorante, elle forme des touffes compactes très ramifiées qui s'élèvent à une vingtaine de centimètres au-dessus du sol. Il pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocailleux et dans les garrigues. Les feuilles du thym sont plus au moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice quant à lui, est tubuleux à deux lèvres et la corolle est plus au moins exserte à deux lèvres aussi (**Quezel et Santa, 1963**).

II.1.4 Localisation et répartition géographique

II.1.4.1 Dans le monde

Le thym est distribué dans le vieux continent, sur les côtes du Groenland et dans la région macaronisienne (les canaries, Madère et les Açores). C'est une plante très répandue dans le nord ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye) ainsi que dans les montagnes d'Ethiopie, les montagnes d'Arabie du sud ouest et la péninsule de Sinaï. Passant par les régions arides de l'Asie occidentale jusqu'à l'Himalaya, il peut même atteindre les limites de la région tropicale et du Japon. Dans le nord, il pousse en Sibérie et en Europe nordique. (Jalas, 1971).

La figure 1, montre la répartition du thym dans le monde (Stahl-Biskup, 2002).

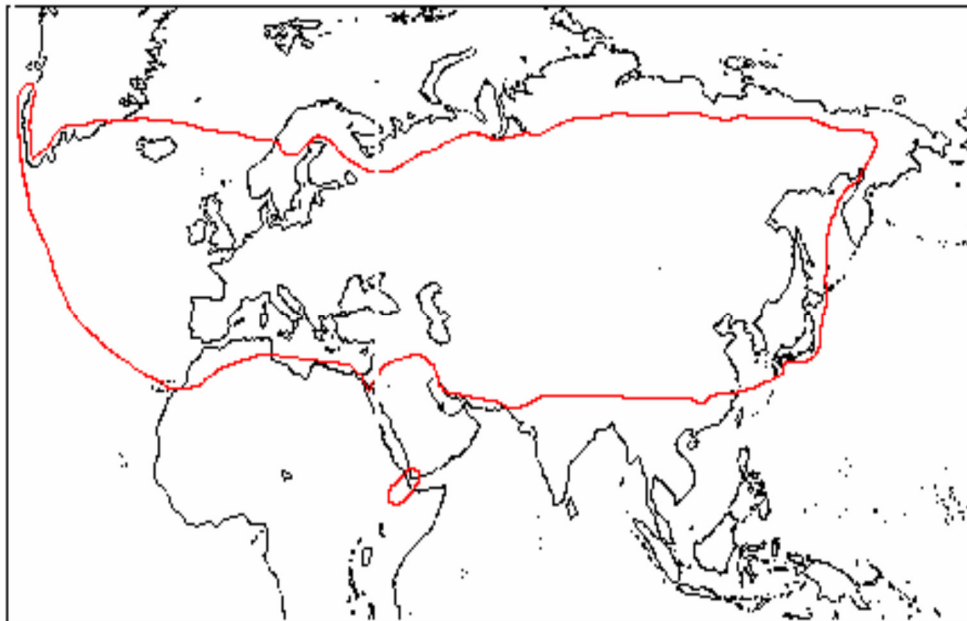


Figure 1 : Répartition géographique du thym dans le monde (Stahl-Biskup, 2002)

II.1.4.2 En Algérie

Le genre *Thymus* inclut environ 300 espèces à travers le monde dont 11 sont localisées en Algérie et 9 d'entre elles sont endémiques (Kabouche et al., 2005). Ces espèces sont réparties du Nord algérois à l'Atlas saharien, et du constantinois à l'oranais (Tableau II).

Tableau II : Principales localisations géographiques du thym en Algérie(Quezel et Santa, 1963)

| Espèce | Localisation et caractéristique |
|--|--|
| <i>Thymus pallescens</i> Boiss. et Reuter | Commun dans le tell Endémique Algérien. |
| <i>Thymus capitatus</i> L. | Très rare dans le sous secteur de l'atlas tellien |
| <i>Thymus dreatensis</i> Batt. | Très rare dans le sous secteur du tell constantinois et de la petite Kabylie. |
| <i>Thymus numidicus</i> Poiret | Assez rare dans : Le sous secteur de l'atlas tellien, le secteur du tell constantinois et petite et grande Kabylie. |
| <i>Thymus guyonii</i> De Noé | Rare dans : Le sous secteur des hauts plateaux Algérois, Oranais et constantinois. |
| <i>Thymus lanceolatus</i> Desf. | Rare dans : Le sous secteur de l'atlas tellien (Terni) et de l'atlas tellien (Médéa, Benchicao). Le sous secteur des hauts plateaux Algérois, Oranais (Tiaret) et constantinois (Aumale). |
| <i>Thymus pallidus</i> Coss | Très rare dans le sous secteur de l'atlas Saharien constantinois. |
| <i>Thymus glandulosus</i> Lag. | Très rare dans le sous-secteur des hauts plateaux Algérois et Oranais. |
| <i>Thymus hirtus</i> Willd. | Commun sauf sur le littoral. |
| <i>Thymus algériensis</i> Boiss. et Reuter | Très commun dans toutes les régions montagneuses et rares ailleurs. |
| <i>Thymus munbyanus</i> Desf. | Endémique dans le nord du secteur algérois. |

II.1.5 Huile essentielle du thym

L'HE du thym est extraite principalement à partir des feuilles et des sommités fleuries. La tige fleurie du thym contient en plus de l'HE des flavonoides (thymonine, cirsilinéol et 8-méthoxy- cirsilinéol) et des acides- phénols (notamment caféique et rosmarinique), des tanins et une résine (Haraguchi *et al.*, 1996). Selon la littérature, plus de 84 HE du genre *Thymus* ont été analysées de 1960 à 1989 (Stahl- Biskup, 2002).

L'HE du thym est une huile susceptible de présenter de grandes variations, qui sont principalement d'origine génétique et édaphoclimatiques, elle dépend également de la saison de cueillette (stade végétatif).

II.1.6 Principales utilisations du thym

Le thym possède un large spectre d'utilisation, parmi lesquelles on peut citer :

- Confection de savons, parfums et détergents ;

II. Monographie des plantes étudiées

- Considéré comme une herbe médicinale avec une action antispasmodique, fluidifiante réduisant la flatulence ;
- Son usage est très reconnu pour soulager les symptômes de la bronchite, inflammation des voies respiratoires, troubles gastro-intestinaux, traiter la stomatite, la laryngite et les blessures cutanées superficielles ;
- L'herbe séchée est employée pour donner de la saveur à la viande, conserves et aux sauces ;
- Le thym produit un miel distinctif qui commence à trouver des marchés de place en Europe et en Asie.

II.2 Le Romarin

II.2.1 Description morphologique

Le romarin est un arbrisseau aromatique de la famille des Lamiacées (Labiées), touffu, rameux, d'environ 1m de hauteur à tige ligneuse, à feuilles persistantes opposées. Les fleurs axillaires à corolle de type « labiée » sont de couleur bleu pâle à bleu violet clair. Le romarin tire son nom du latin *Rosmarinus*, qui signifie « rosée de mère », reconnu pour saveur piquante et parfumée assez prononcée (Wicht et Anton, 2003).

II.2.2 Classification

Le romarin appartient à :

Embranchement: Spermaphytes

Classe : Dicotylédones

Ordre: Lamiales (labiales)

Famille: Lamiaceae

Genre: *Rosmarinus*

Espèce: *Rosmarinus officinalis* L. (Quezel et Santa, 1963).

II.2.3 Localisation et répartition géographique

Originaire des régions méditerranéennes, le romarin pousse spontanément dans le Sud de l'Europe. On le cultive dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps, il apprécie les climats chauds, modérément secs, les branches récoltées pendant l'été sont séchées à l'air et à l'ombre (Heinrichet *al.*, 2006).

II.2.4 Huiles essentielle du romarin

L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient: de l' α pinène (7 à 80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 35%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène. En plus de l'huile essentielle on trouve dans le *Romarin*: 2 à 4 % de dérivés triterpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol; des lactones diterpéniques picrosalvine, dérivées de l'acide canosolique, romanol, romadial, des acides phénoliques, des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque, des acides gras organiques l'acide citrique, glycolique, et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage (**Bellakhdar, 1997**) et de la résine (**Beloued, 1998**).

II.2.5 Principales utilisations du romarin

Le romarin est souvent cultivé pour son huile essentielle. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique. Il est considéré utile pour contrôler l'érosion du sol, L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires (**Heinrich et al., 2006**).

**Evaluation de
l'activité
antimicrobienne**

III.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE

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

III.1.1 Principales méthodes

Les différents protocoles peuvent être classés selon:

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

III.1.1.1 Techniques par contact direct

Elles consistent à mettre en contact l'HE ou les extraits avec les microorganismes, puis d'observer la croissance de ces derniers. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé ou liquide (Figure 2). L'aromatogramme ou encore méthode des disques est l'une de ces méthodes. Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester. Les disques sont ensuite déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension bactérienne à étudier. Après incubation, les bactéries se développent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'HE ou d'extrait suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée « zone d'inhibition ». Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible au produit testé. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (**Fauchère et Avril, 2002**).

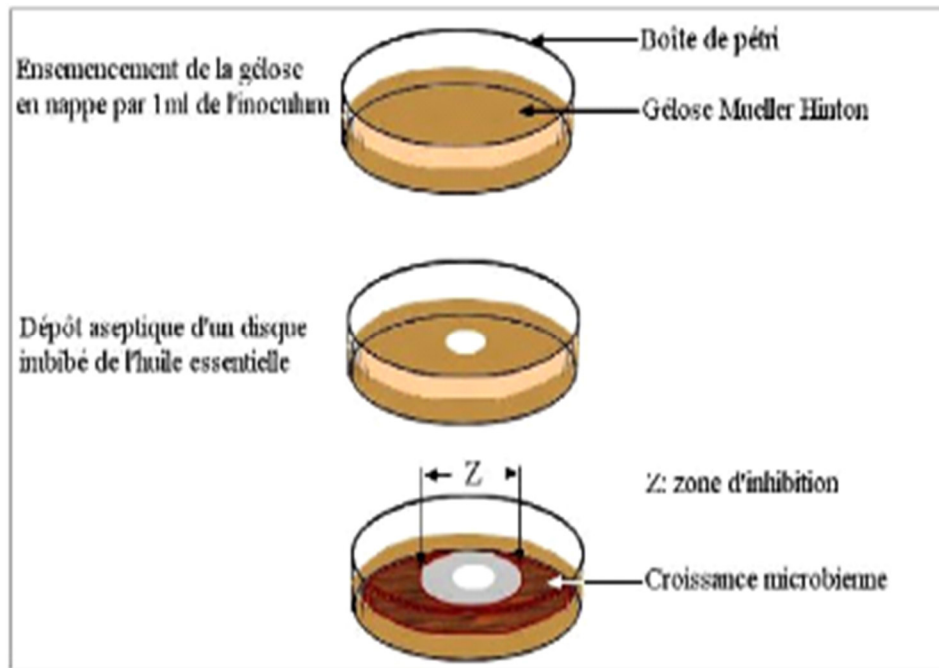


Figure 2 : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).

III.1.1.2 Micro-atmosphère

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience (Figure 3). Il se produit alors une évaporation des substances volatiles dans la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de l'inoculum (Hulin *et al.* 1998). L'inconvénient de cette méthode c'est qu'elle ne montre que l'activité des constituants volatils à température d'incubation, et non de l'HE elle-même.

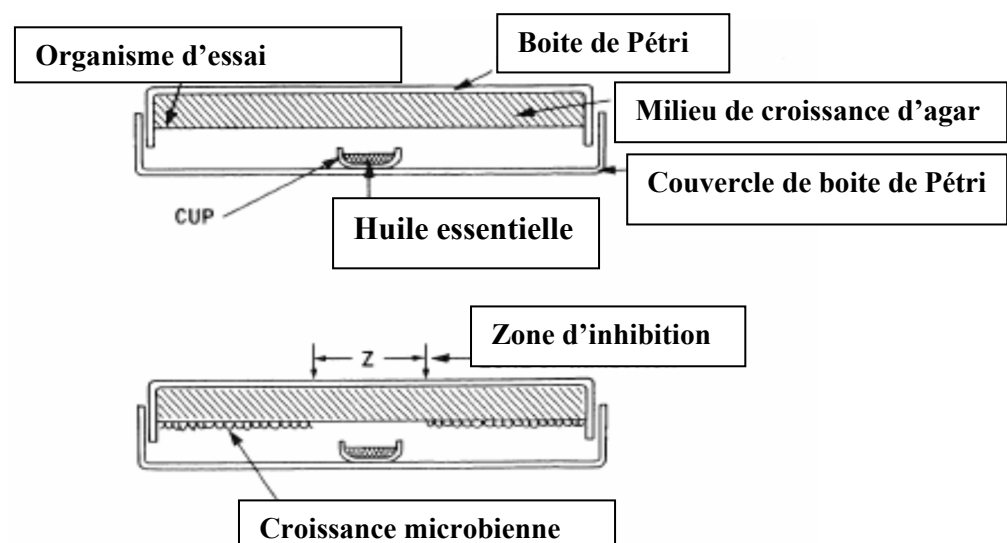


Figure 3 : Illustration de la méthode des micro-atmosphères (Zaika, 1988)

III.3.1 Propriétés antibactériennes

En 1987, **Deans et Ritchie** ont étudié l'effet de 50 HE sur 25 genres de bactéries, grâce à la méthode des puits. Ils ont abouti au fait que uniquement 9 HE qui manifestent des propriétés inhibitrices les plus importantes sur plus de 20 genres de bactéries, on retrouve notamment l'HE du thym, romarin, laurier, de la cannelle et du clou de girofle.

III.3.2 Propriétés antifongiques

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

Matériel et méthodes

IV. Matériel et méthodes

L'objectif de ce travail est l'extraction des huiles essentielles du thym et du romarin, puis l'évaluation de leurs activités antibactériennes vis-à-vis de quatre souches à Gram négatif et une à Gram positif, et antifongique vis-à-vis de *Botrytis cinerea*.

IV.1 Matériel végétal

Cette présente étude a porté sur deux plantes médicinales du nom scientifique « *Rosmarinus officinalis L.* » (figure 4) appelée localement « Aqlil ou Amezir » et en arabe « Iklil El Djabel » récoltés de deux régions à savoir : Akbou et Adekar et « *Thymus munbyanus* » (figure 5) appelée localement « Tizaert », en arabe « Zaitra » provenant d'Ouzellaguen.



Figure 4 : Photographie de *Rosmarinus officinalis L.*



Figure 5 : Photographie de *Thymus munbyanus*

IV.1.1 Collecte et séchage

Les feuilles de *Rosmarinus officinalis* ont été cueillies au mois de Février 2018, et en mois de juillet 2017 pour les feuilles et les sommités fleuries du *Thymus munbyanus*. Une quantité d'échantillon est soumise à 105 °C pendant 24 heures pour l'évaluation du taux d'humidité. Alors que le reste de la récolte est séché à l'abri de la lumière et à température ambiante.

IV.2 Extraction des huiles essentielles

L'hydrodistillation est considérée comme le seul mode d'extraction retenu par la Pharmacopée Européenne (Kabouche *et al.*, 2005). L'extraction des huiles essentielles est réalisée en utilisant un appareil de type Clevenger modifié (figure 6).



Figure 6 : Photographie d'hydrodistillation de Clevenger modifié

La matière végétale (100 g), constituée des feuilles pour *R.officinalis L*, des feuilles et sommités fleuries pour *Thymus munbyanus*, sont introduites dans un ballon de 2L rempli d'eau jusqu'au 2/3 de sa capacité. Ces dernières sont ensuite mises à ébullition pendant 3 heures. Le ballon ainsi chauffé, produit de la vapeur chargée de produits volatils. Cette vapeur se condense au contact d'un réfrigérant. Le condensat est ensuite recueilli dans une ampoule à décanter lieu où s'effectue la séparation des deux phases non miscibles : phase aqueuse et phase organique. Cette dernière constitue l'HE qui sera récupérée et conservée à une température de 4°C dans un flacon en verre fumé, en vue de son analyse.

➤ Rendement d'extraction en HE

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle et la masse du matériel végétal utilisé pour cent grammes de matière végétale

$$R_{HE}\% = M_{HE}/M_s.100$$

sèche. Après récupération d'huiles essentielles, le rendement est calculé par la méthode suivante :

R_{HE} : Rendement en huile essentielle en (g) pour 100 g de la matière sèche

M_{HE} : Masse d'huiles essentielles récupérées (g)

M_s : Prise d'essai du matériel végétal (g).

IV.3 Evaluation de l'activité antibactérienne des HE étudiées

IV.3.1 Origine et choix des souches bactériennes

Les microorganismes utilisés pour la détermination de l'activité antibactérienne sont : trois souches phytopathogènes à savoir : *Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* et deux souches pathogènes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Ces souches proviennent de l'institut Pasteur d'Alger. Ces dernières ont été choisies pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité. Les caractéristiques de ces souches bactériennes testées sont présentées dans le tableau III.

Tableau III : Caractéristiques des souches bactériennes testées

| Nom de la souche | Référence | Gram | Famille | Principales infections Causées |
|--|------------|------|---------------------------|---|
| <i>Dickeya solani</i> (DS) | 22.22 | - | <i>Enterobacteriaceae</i> | Symptôme de jambe noire sur les tiges (pomme de terre). |
| <i>Pectobacterium carotovorum</i> (PCC) | 88.22 | - | <i>Enterobacteriaceae</i> | Pourritures humides sur tiges et/ou sur fruits. |
| <i>Pectobacterium atrosepticum</i> (PCA) | 86.21 | - | <i>Enterobacteriaceae</i> | Pourriture molle bactérienne et de la jambe noire chez la pomme de terre. |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC A 404 | - | <i>Enterobacteriaceae</i> | Diarrhées dysentériques Gastro-entérites. |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 8577 | + | <i>Micrococcaceae</i> | Gastro-entérites Infections urinaires. |

IV.3.1.1 Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 18h, des suspensions bactériennes sont réalisées en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques, et les mettre dans 4 ml d'eau physiologique stérile. Après une brève agitation au vortex, la transmittance est lue au spectrophotomètre

UV-Vis avec une longueur d'onde de 625 nm appropriée pour chaque souche, afin d'obtenir une concentration bactérienne de 10^6 UFC/ml.

IV.3.1.2 Etude qualitative de l'activité antibactérienne

Cette activité est évaluée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé selon la technique décrite par **Bagamboula *et al.*, (2004)**.

Après avoirensemencé en surface les boîtes de Pétri contenant la gélose MH (Mueller Hinton) avec une suspension bactérienne de 18 à 24 heures. Des disques stériles en cellulose de 6 mm de diamètre sont déposés sur la surface de la gélose, puis imprégnés de 5 μ l de chaque HE seul ou en associations : thym/romarin Akbou, thym/romarin Adekar (v/v : 1/1). En parallèle, un disque d'antibiotique (Oxacilline) est déposé pour chaque souche bactérienne.

Les boîtes sont ensuite mises à 4 °C pendant 30 min afin de permettre une meilleure diffusion de l'huile essentielle. Après une période d'incubation de 24 heures à la température de croissance du germe cible, la lecture des résultats s'est réalisée par la mesure du diamètre (en mm) de la zone claire autour des disques, appelée : zone d'inhibition (figure 7).

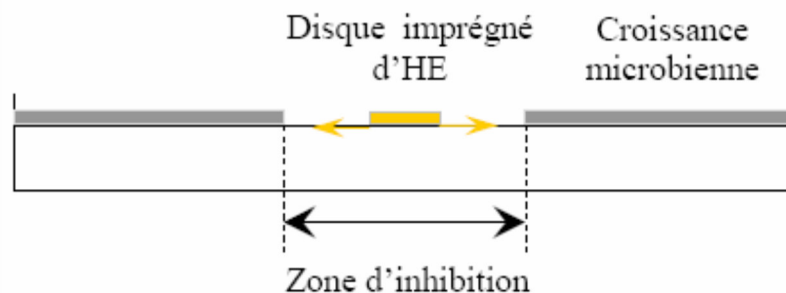


Figure 7 : Schéma simplifié du principe de la méthode des aromatochromes (Smith et Navilliat , 1997).

IV.4. Evaluation de l'activité antifongique

IV.4.1. Les souches fongiques testées

L'action des HE de *Thymus munbyanus* et *Rosmarinus officinalis* testée seule ou en association a été étudiée sur trois isolats de *Botrytis cinerea* . Cette souche est un phytopathogène de la famille des *Muniliaceae*, connue sous le nom de la pourriture grise. Elle provoque l'une des maladies cryptogamiques les plus destructives des cultures sous serres (**Bouchet *et al.*, 2005**). Les isolats de *Botrytis cinerea* testés sont : ALG 163, ALG 171 et ALG 174.

IV.4.2. Etude qualitative de l'activité antifongique des HE

Cette étude consiste à suivre la croissance mycélienne des souches testées selon la méthode de **Wang et Coley-Smith (1986)**.

Cette méthode est basée sur le dépôt d'un disque stérile en cellulose de 6 mm de diamètre imprégnés de 5 µl de chaque HE seule ou en associations : thym/romarin Akbou, thym/romarin Adekar (v/v : 1/1) et un autre disque opposé à la souche à tester, obtenu à partir d'une culture jeune de 3 jours sur la surface d'une gélose (PDA) préalablement coulée dans une boîte de Pétri. La lecture des résultats se fait par la mesure de la croissance mycélienne pendant 7 jours d'incubation à 22 °C. En parallèle, des disques remplis d'H₂O servant de témoins négatifs. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition de la croissance mycélienne (\%)} = [(DC - DT) / DC] \times 100$$

Avec :

DC : Diamètre moyen de croissance mycélienne du control ;

DT : Diamètre moyen de croissance mycélienne du traitement.

IV.4. Analyse statistique

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité antifongiques des HE testées sont fait l'objet d'une étude statistique par l'analyse de la variance à une variable (ANOVA-MANOVA) en utilisant le logiciel Statistica 5.5.

Tous les histogrammes obtenus ont été réalisés en utilisant les deux logiciels : Excel (Microsoft Office 2003).

Résultats & discussion

V. Résultats et discussion

1. Rendement d'extraction en huile essentielle

Les rendements d'extractions en huiles essentielles des feuilles et des sommités fleuries du thym, et des feuilles du romarin sont exprimés en pourcentage période de (tableau IV).

Tableau IV : Rendement d'extraction en HE des espèces étudiées

| Espèces | Rendement (%) |
|--|---------------|
| <i>Thymus munbyanus</i> | 2,80 |
| <i>Rosmarinus officinalis L</i> (Akbou) | 2,05 |
| <i>Rosmarinus officinalis L</i> (Adekar) | 3,47 |

D'après le tableau IV, le meilleur rendement d'extraction en HE est enregistré au niveau de l'échantillon du romarin provenant de la région d'Adekar (3,47%) tandis que l'échantillon du romarin d'Akbou a donné le plus faible rendement (2,05 %).

L'HE extraite à partir des feuilles et sommités fleuries de *T. munbyanus* provenant de la région d'Ouzellaguen, est de couleur jaunâtre.

En se référant à la littérature, le rendement obtenu avec l'espèce *Thymus munbyanus* est supérieur à ceux rapportés par **Hazzit (2009)** et **Benchabane et al., (2012)** en travaillant sur la même espèce. Les rendements obtenus par ces auteurs sont respectivement de 1,8 et 2,3 %. Les travaux de **Hazzit et al., (2009)** sur trois espèces du genre *Thymus* poussant en Algérie (*T. algeriensis*, *T. pallescens* et *T. dreatensis*), ont rapporté que les rendements en HE enregistrés varient entre 0,4 et 6,4 %. Cet écart est probablement attribué à la différence de provenance du matériel végétal ainsi qu'à la période de récolte.

L'HE extraite à partir des feuilles de *R. officinalis L* provenant des régions d'Akbou et Adekar est de couleur jaune clair. D'après la littérature, le rendement obtenu avec les échantillons du romarin est supérieur à celui signalé par **Zaouali et al., (2010)**, en travaillant sur la même espèce poussant en Tunisie. Les rendements obtenus par ces auteurs varient entre **1,17** et **2,70** %. Cette variation est probablement attribuée à la différence des conditions climatiques ainsi qu'à la période de récolte et le type de sol.

Selon **Fellah et al. (2006)**, cette variation dans le rendement peut être attribuée non seulement à l'origine de la plante et à la technique d'extraction mais également à la période de

la cueillette de la matière végétale. D'autre part, le cycle végétatif et la période de cueillette peut également influencer sur le rendement d'extraction des HE.

2 .Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

2 .1. Etude qualitative de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des HE est évaluée en fonction du diamètre (mm) des zones d'inhibition de la croissance bactérienne (**Dorman et Deans, 2000**).

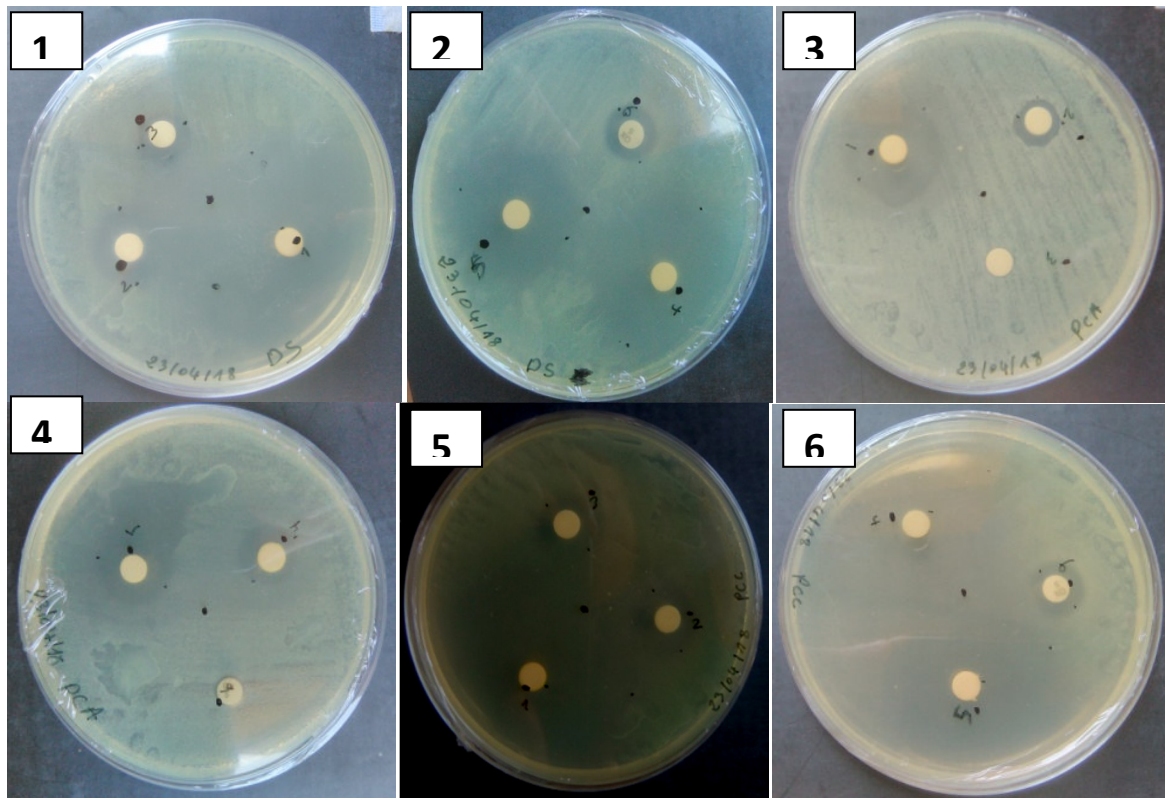
L'estimation de l'activité antibactérienne des HE est basée sur une échelle de mesure mise en place par **Meena et Sethi (1994)** et **Ela et al. (1996)**. Ces derniers ont classé le pouvoir antibactérien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne, en 04 classes :

1. Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28 mm ;
2. Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 16 et 28 mm ;
3. Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 10 et 16 mm ;
4. Non inhibitrice lorsque le diamètre d'inhibition est inférieur à 10 mm.

Nos résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous ainsi que les figures (8,9,10) représentent les diamètres des zones d'inhibitions.

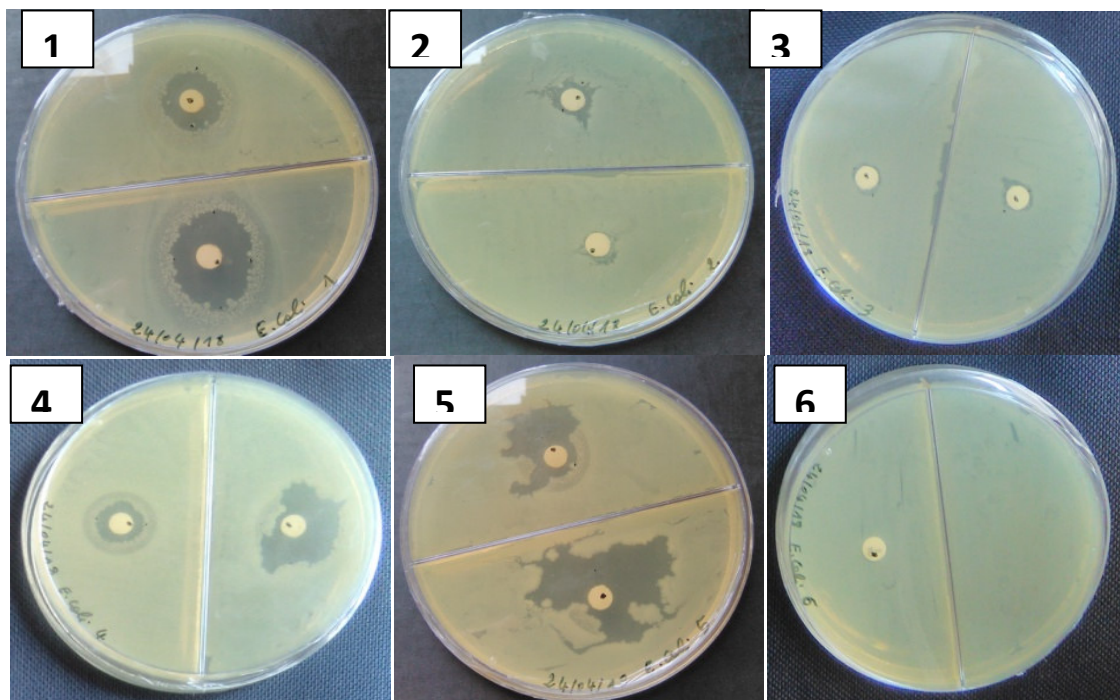
Tableau V : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des bactéries testées

| Souches | <i>D. solani</i> | <i>P. atrosepticum</i> | <i>P. carotovorum</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
|------------------------|------------------|------------------------|-----------------------|----------------|------------------|
| HE | | | | | |
| Thym | 43,48 ± 7,91 | 21,36 ± 1,59 | 46,04 ± 5,26 | 16,64 ± 2,44 | 37,46 ± 0,43 |
| Ros .Ak | 16,38 ± 1,70 | 9,77 ± 1,66 | 15,94 ± 0,46 | 6,00 | 6,00 |
| Ros .Ad | 13,30 ± 1,11 | 6,00 | 15,72 ± 2,26 | 6,00 | 6,00 |
| As .Th .Ros .Ak | 36,89 ± 1,58 | 16,15 ± 1,64 | 33,66 ± 0,93 | 15,58 ± 4,21 | 32,01 ± 0,98 |
| As .Th .Ros .Ad | 33,82 ± 2,82 | 16,76 ± 0,99 | 35,02 ± 0,59 | 10,71 ± 0,79 | 32,56 ± 2,54 |
| Oxacilline | 13,83 ± 0,43 | 6,00 | 12,44 ± 1,44 | 6,00 | 35,35 |



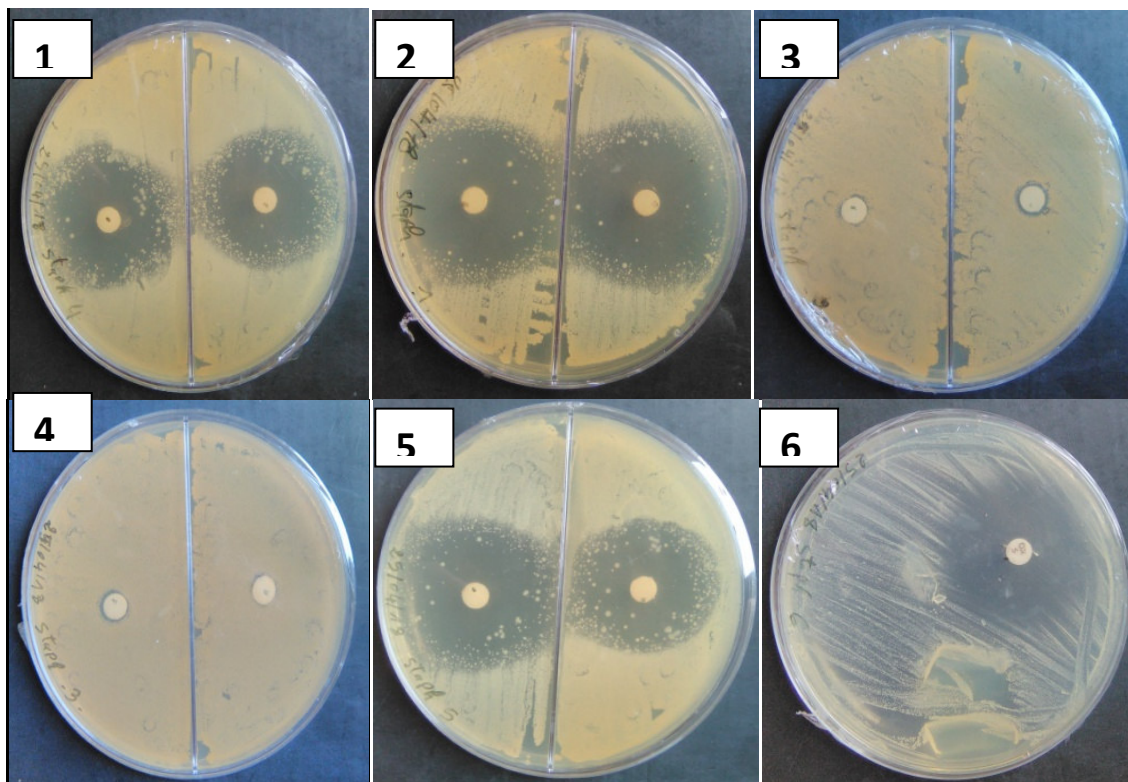
1: HE Th ; 2 : HE Ros Ak ; 3 : HE Ros Ad ; 4 :AS.Th.Ros.AK. ; 5 : AS.Th.Ros.Ad ; 6 :Oxacilline

Figure 8 : Zones d'inhibition des HE de *Thymus munbyanus*, *Rosmarinus officinalis* et d'oxacilline testées sur les souches phytopatogènes (*D.solani*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*)



1: HE Th ; 2 : HE RosAk ; 3 : HE Ros Ad ; 4 :AS.Th.Ros.AK. ; 5: AS.Th.Ros.Ad ; 6 :Oxacilline

Figure 9 : Zones d'inhibition des HE de *Thymus munbyanus*, *Rosmarinus officinalis* et oxacilline testées sur *Escherichia coli*



1 : HE Th ; 2 : HE Ros Ak ; 3 : HE Ros Ad ; 4 :AS.Th.Ros.AK. ; 5 : AS.Th.Ros.Ad ; 6 :Oxacilline

Figure 10 : Zones d'inhibition des HE de *Thymus munbyanus*, *Rosmarinus officinalis* et l'oxacilline testées sur *Staphylococcus aureus*

D'après les résultats du tableau V et les figures 8,9 et 10 :

Pour les bactéries Gram négatif

L'HE du *Thymus munbyanus* a une très forte action inhibitrice sur *Pectobacterium carotovorum* (PCC) et *Dickeya solani* (DS) avec des zones de 46,04 et 43,48mm respectivement, et modérément inhibitrice sur *Pectobacterium atrosepticum* (PCA) et *E. coli* avec des zones de 21,36 et 16,64 mm respectivement.

L'HE du *Rosmarinus officinalis* d'Akbou a une action modérément inhibitrice sur *Dickeya solani*, mais légèrement inhibitrice avec *Pectobacterium carotovorum*, par contre une très faible activité sur *Pectobacterium atrosepticum*. Cependant, la souche la plus résistante à l'action de l'HE testée est *E. coli*.

L'HE du *Rosmarinus officinalis* d'Adekar a une activité légèrement inhibitrice vis-à-vis des souches *Pectobacterium carotovorum* et *Dickeya solani*. Par contre *Pectobacterium atrosepticum* et *Escherichia coli* sont avérées les plus résistantes à l'action de l'HE du romarin d'Adekar.

L'association entre les deux HEs ; le thym et le romarin d'Akbou (**AS.Th.Ros.AK.**) d'une part et entre la combinaison entre l'HE de thym et romarin d'Adekar (**AS.Th.Ros.Ad.**) ont montré une forte activité inhibitrice sur *Dickeya solani* et *Pectobacterium carotovorum*, une action modérément inhibitrice sur *Pectobacterium atrosepticum* et une action légèrement inhibitrice sur *Escherichia coli*.

L'antibiotique testé dans notre étude à savoir l'oxacilline a démontré une faible activité inhibitrice pour les bactéries Gram négatives, et une action fortement inhibitrice pour *St.aureus*, par comparaison avec l'action des huiles essentielles étudiée, l'oxacilline à une faible activité inhibitrice.

Pour la bactérie Gram positif

L'huile essentielle de *Thymus munbyanus* a une forte activité inhibitrice sur *Staphylococcus aureus*.

Les HE de *Rosmarinus officinalis .L* d'Akbou et d'Adekar ont une action légèrement inhibitrice sur *st. aureus*.

Les deux combinaisons entre *Thymus* et *Rosmarinus* ont montré une forte action inhibitrice vis-à-vis de cette souche à Gram +.

2.2 .Evaluation de l'activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique des échantillons a été réalisée sur 3 isolats de *Botrytis cinerea*, ceci par la méthode des aromatoigrammes. Le pouvoir antifongique des HE de *Rosmarinus officinalis* cueillie dans deux régions de la willaya de Bejaia (Akbou et Adekar), et de *Thymus munbyanus* provenant d'Ouzellaguen, est obtenu par le suivi de la cinétique de croissance mycélienne. Les principaux résultats obtenus lors de la détermination de l'effet des HE testés seuls ou en associations sur la cinétique de croissance mycélienne sont illustrés dans les figures 11,12 et 13 et dans les annexes.

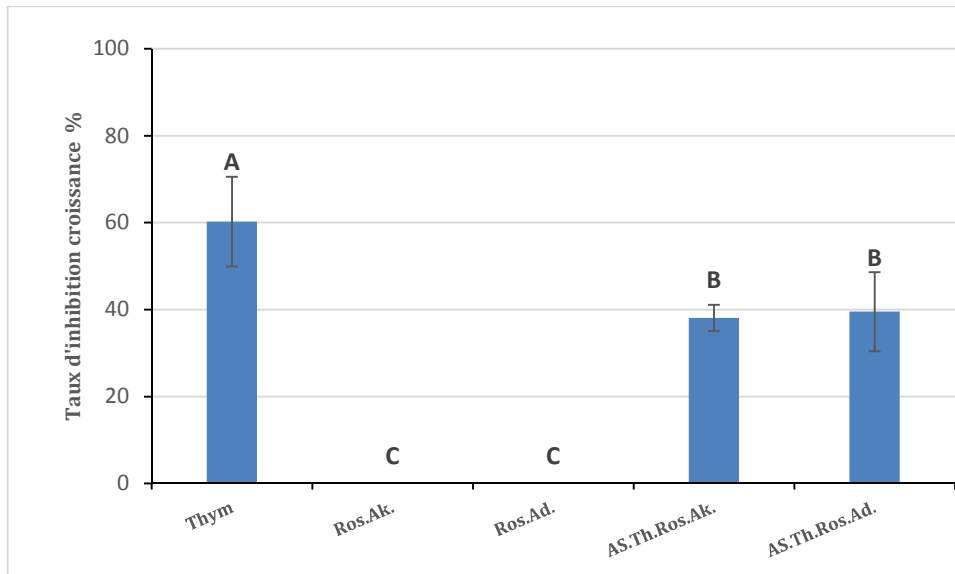


Figure 11 : Taux d'inhibition moyens de croissance mycélienne de *B.cinerea* (ALG 163) traitée avec les HEs étudiées

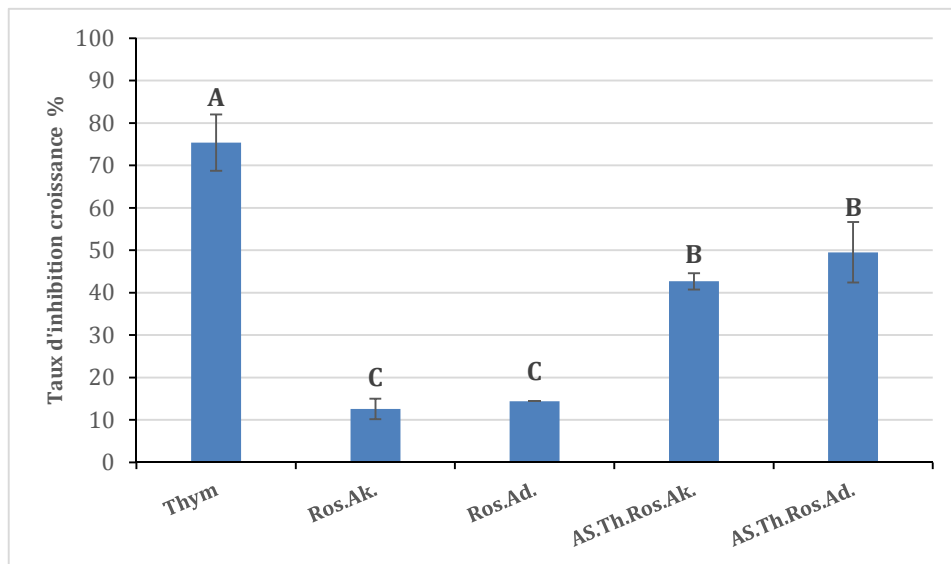
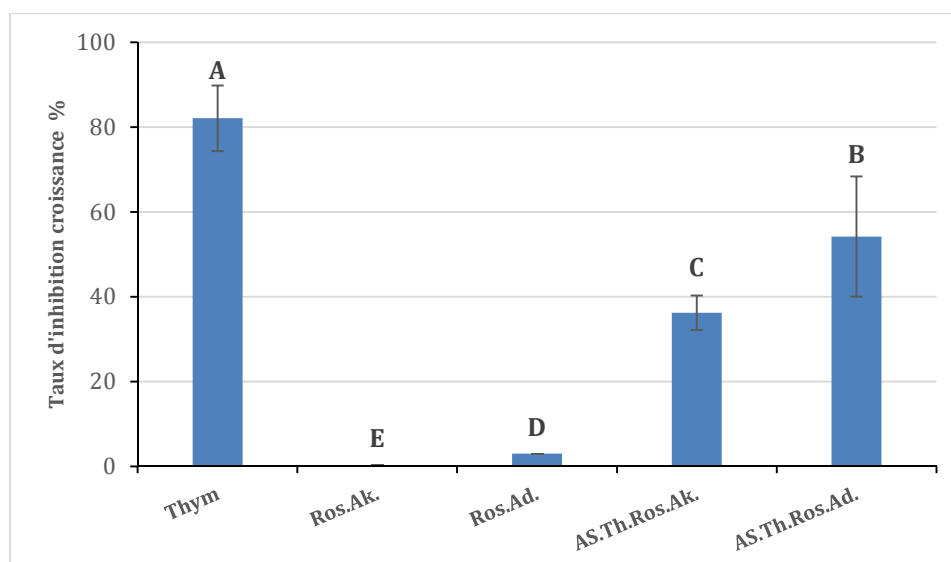


Figure12 : Taux d'inhibition moyens de croissance mycélienne de *B.cinerea* (ALG 171) traitée avec les HE étudiées



Légendes: **Thym** : HE *Thymus munbyanus* ; **Ros.Ak.** : HE *Rosmarinus officinalis* L d'Akbou. **Ros.Ad.** : HE *Rosmarinus officinalis* L d'Adekar. **AS.Th.Ros.Ak.** : Association HEs *T.munbyanus* et *R. officinalis* L d'Akbou. **AS.Th.Ros.Ad.** : Association HEs *T.munbyanus* et *R. officinalis* L d'Adekar.

Figure 13 : Taux d'inhibition moyens de croissance mycélienne de *B.cinerea* (ALG 174) traitée avec les HEs étudiées

D'après les allures des graphiques présentés dans les figures 11, 12 et 13, les HE de *Thymus munbyanus* et de *Rosmarinus officinalis* provenant d'Akbou et Adekar, on a constaté que :

Seul l'HE de *Thymus* a exercé un effet inhibiteur élevé de la croissance mycélienne vis-à-vis de toutes les souches fongiques testées (60,22 à 82,11%). La comparaison des taux d'inhibitions moyens de la croissance mycélienne des différentes souches traitées avec cette huile révèle que la souche la plus sensible est ALG 174 (82,11%), et ALG 171 (75,38 %), tandis que la souche la moins sensible à l'action de cette huile est ALG 163 (60,22%).

D'après l'analyse statistique (ANOVA) effectuée, il apparaît clairement l'existence d'une différence significative ($p < 0,05$) entre les taux d'inhibition de la croissance mycélienne de chaque souches où :

La souche ALG 163 est avérée la plus résistante vis-à-vis de l'HE de *Thymus munbyanus* avec un pourcentage d'inhibition moyen de (60.22%), alors que la souche ALG s'est montrée la plus vulnérable à l'action de cette huile (81.11 %).

L'HE du romarin d'Akbou n'a manifesté aucun effet inhibiteur vis-à-vis de la croissance mycélienne des deux souches testées : ALG 163 et ALG 174, et une faible activité inhibitrice envers la souche fongique BC ALG 171 (12,58%).

L'HE du romarin récolté à Adekar n'a également exercé aucun effet inhibiteur vis-à-vis de la croissance mycélienne de la souche fongique BC ALG 163 et une faible activité inhibitrice vis-à-vis les souches fongiques BC ALG 171 (14,43%) et BC ALG 174 (3,01%).

La combinaison entre les deux huiles essentielles de *Thymus munbyanus* et de *Rosmarinus officinalis* provenant de la région d'Akbou d'une part et l'association entre l'HE *Thymus munbyanus* et celle du romarin d'Adekar de l'autre part, ont exercé des effets inhibiteurs considérables de la croissance mycélienne vis-à-vis de toutes les souches fongiques testées. Les valeurs enregistrées oscillent entre 36,26 à 42,68% pour l'AS.Th.Ros.AK. et entre 39,52 et 54,24% pour l'AS.Th.Ros.Ad.

Enfin, les effets antibactériennes et antifongiques des associations d'huiles essentielles de *Thymus munbyanus* et *Rosmarinus officinalis* ont montré l'existence d'une interaction antagoniste où, l'HE du romarin a diminuée fortement l'activité de l'HE du thym, cela est dû probablement à la composition chimique de ces deux huiles.

En effet, cette efficacité peut être due au réservoir des composés phénoliques et terpéniques des plantes. Dans ce sens, une étude publiée par **Valnet (2005)** a montré que les composés chimiques ayant une efficacité antifongique à large spectre sont les phénols, les aldéhydes, les alcools et les cétones terpéniques. Les meilleures activités ont été observées pour les huiles de thym, d'origan, de clous de girofle, d'armoise blanche, tous riches en composés phénoliques (thymol, carvacrol et eugénol).

En **2000, Dorman et Deans** ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antimicrobienne, suivi du carvacrol et du γ -terpinéol. **Dimitra et al., (2004)**, ont trouvé que l'HE de l'origan riche en thymol et le thym riche en carvacrol ont un bon effet inhibiteur sur *B. cinerea*.

Cependant la faible activité antifongique les HE du romarin étudiée serait due à sa composition chimique en particulier et sa richesse en α -pinène.

Conclusion & perspectives

Conclusion et Perspectives

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus munbyanus* et de *Rosmarinus officinalis* et l'association entre les huiles, *vis-à-vis* de cinq souches, et antifongique envers *Botrytis cinerea*.

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation a fourni des rendements de 2,8% (ml/100g de matière végétale sèche) pour le thym et 2,05 et 3,47% pour le romarin.

Dans notre étude, l'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée par la méthode des aromagrammes.

Parmi les HE testées, la meilleure activité est obtenue avec l'huile essentielle de *Thymus munbyanus* (16,64 et 46,04mm) suivie de l'HE du romarin provenant de la région d'Akbou. Tandis que pour les associations, les deux combinaisons ont exprimé des activités proches l'une de l'autre.

L'activité antifongique sur trois isolats de *B. cinerea* (ALG 163, ALG 171 et ALG 174) évaluée par la méthode de confrontation directe a mis en évidence le puissant pouvoir de l'huile essentielle de *Thymus munbyanus* vis-à-vis de la croissance mycélienne de toutes les souches cibles, tandis que les HE du romarin ont montré une très faible activité inhibitrice. Il est à noter également que les associations entre les huiles essentielles (*Thymus* et *Rosmarinus*) ont manifesté une action inhibitrice intéressante sur l'ensemble des souches testées.

Enfin, les activités antibactériennes et antifongiques des associations entre les huiles essentielles de *Thymus munbyanus* et de *Rosmarinus officinalis* ont montré l'existence d'une interaction de type antagonisme où, l'HE du romarin a diminuée fortement l'action de l'HE du thym.

Toutefois, ces résultats restent préliminaires et afin de les approfondir, d'autres approches et études sont souhaitables à réaliser, il serait intéressant de :

- Tester d'autres méthodes d'extractions pour déterminer leur influence sur le rendement en huiles essentielles ;
- Caractériser chimiquement les HE extraites ;
- Etudier d'autres propriétés biologiques de ces plantes, à savoir les propriétés anti-inflammatoires et insecticides ;
- De vérifier les résultats expérimentaux dans une matrice alimentaire .

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Afnor, (2000). Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle.
Ed. Afnor, Paris.

Anon, (2003). Major groups, families and Genera: Lamiaceae (Labiatae). *Science and Horticulture*, Royal Botanic Garden. Kew UK.

B

Bagamboula C.F., Uyttendaele M., Debevere J., (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-Cymène towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, **21**, 33–42.

Belakhdar, J (1997) : La pharmacopée marocaine traditionnelle. Idis PRESS(Ed). Paris, p. 764.

Beloued, A (1998) : Plantes médicinales d'Algérie. 2^{ème} Edition .Office des publications.

Benchabane O, Hazzit M, Baaliouamer A, Mouhouche F. (2012). Analysis and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Ferula vesceritensis* Coss. Et Dur. And *Thymus munbyanus* Desf, *Jeobp* 15 (5) 2012 pp 774 – 781.

Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M. et Gaset A., (1988). Extraction des huiles essentielles. Chimie et technologie. Information chimie.

Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S. et Abrini J., (2006). *Thymus* essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc, 09- 12 Mai 2006

Bouchet P., Guignard J.L., Pouchus Y.F et Villard J., (2005). Les champignons : Mycologie fondamentale et appliquées. Edition: Masson. Paris .801.

Références bibliographiques

Bruneton, J. (1987). Eléments de phytochimie et de pharmacognosie . Paris :Ed .Tec et Doc .
Lavoisier.

Bruneton J., (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2ème Ed. Lavoisier,
385-623.

Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier, 3ème
Edi, Paris. 585 P.

Bruneau C., (2005). Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* (Poiret) from Algeria.
Flavour and Fragrance Journal, **20**, 235–236.

C

Conner D. E., (1993). Naturally occurring compounds, 441-468. *In* Davidson P. M. and
Branen A. L. Antimicrobials in foods, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y

Chiej R. : les plantes médicinales .Ed .Solar, 1982.

D

Delaigne R., (1930). Les essences naturelles et parfums, Ed. Armond colin, Paris **Durvelle**

J.P., 1930. Fabrication des essences et des parfums. Ed. des gorges, Paris.

De Billerbeck K.V.G., Roques C., Vanière P., et Marquier P. (2002). Activité
antibactérienne et antifongique de produits a base d'huiles essentielles. *Hygiène*, 10(3),248-
251.

Deans, S. G. et Ritchie G., (1987). Antibacterial properties of plant essential oils.

International Journal of Food Microbiology, **5**, 162-180.

Dimitra J., Daferera, Basil N., Ziogas, Moschos G. et Polissiou.,(2004). The effectiveness
of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter*
michiganensis subsp. michiganensis. *Crop protection*, **22**, 39-44.

Références bibliographiques

Donelian .A ,L .H. C. Carlson, T.J.Lopes,R.A .F.Machado. (2009). « comparison of extraction of patchouli (pagostemon cablin) essentiel oil with supercritical co2 and by steam distillation »,the journal of supercritical fluids , 48,15-20.

Dorman D.H.G., Bachmayer O. , Kosar M . et Hiltunen R., (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Tuekey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 762-770.

Dorman H. et J.D. Deans S. G., (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 308-316.

E

Ela M.A., El-Shaer N.S., et Ghanem N.B., (1996). Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, **51**, 993 – 995.

Essawi, T., & Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* , 70, pp. 343-349.

F

Fellah, S., Romdhane, M., & Abderraba, M. (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis* L. cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie.*J.Soc.Alger.Chim* , 16 (2), pp. 193-202.

Fauchère J.L. et Avril J.-L., (2002). Bactériologie générale et médicale: Ellipses Editions Paris, 365.

Friedland D., 1975. Industrie américaine des substances aromatiques. *Informations chimie*, **140**, 65-68.

G

Guenther E., (1972). The essential oils, Vol.3, Ed. Robert Krieger publishing co, Huntingtons, New York.

Gutierrez J., Barry-Ryan C.et Bourke P., (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*. **26**, 142–150.

H

Haraguchi H., Saito T., Ishikawa., Date H., Kataoka S., Tamura Y., Mizutani K., (1996). Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*. *Planta Medica*, **62**, 217-221.

Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo A.R ,Faleiro M.L, M.G. Miguel M.G (2009) : Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils, *Food Chemistry* 116, 714–721.

Henri V. (1993). Mes procédés d'extraction des huiles essentielles.Partie 1, d'après des articles de Henri Viaud, distillateur thérapeutiques naturelles, GNOMA.

Henrich, et al (2006) : Ethnobotany and Flavonoids-potent and versatile.

Hitokoto, H, and S Morozumi. (1980)“Inhibitory Effects of Spices on Growth and Toxin Production of Toxigenic Fungi.” *Appl. Environ. Microbiol* 39, no. 4: 818-822.

Hulin V., Mathot A.G., Mafart P. et Dufossé L., (1998). Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, **18**, 563-582

J

Jalas J., (1971). Note of *Thymus* L. (*Labiatae*) in Europe.I. Supraspecific classification and nomenclature. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **64**, 199-215.

K

Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z., Benlabed K., (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*, **15**, 129–133.

Kivrak, I., Duru, M. E., Ozturk, M., Mercan, N., Harmandar, M., & Topçu, G. (2009). Antioxydant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food chemistry*, doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.069.
Article in press.

Khoukhi. N et Benadji.H ; (2013). « L'extraction et la caractérisation de l'huile essentielle de THYM (*Thymus vulgaris*) de Miliana et l'étude de l'activité antibactérienne »; thèse de master ; université de Khemis Miliana.

Knobloch K., Weigand H., Weis N., Schwarm H.M. et Vogenschow H., (1989). Action of terpenoids on energy metabolism. In *Progress in Essential oil Research* ed. Brunke, E.J., 429-445. Berlin, De Gruyter.

M

Maruzzella, J.(1962). “The Germicidal Properties of Perfume Oils. *Perfumery Chemicals*” 77:67-72.

Meynadier, J.M, and N Raison-Peyron. (1997). “Allergie Aux Parfums.” *Re. Fr. Allergol* 37, no: 641–650.

Meena M.R. et Sethi V., (1994). Antimicrobial activity of the essential oils from spices. *Journal of Food Science and Technology Mysore*, **31**, 68 – 70.

Mira .B, Blasco.M ,Subirats. S, (1996). « Supercritical co2 extraction of essential oils from

Références bibliographiques

orange peel », the journal of supercritical fluids , ,9 , 238-243 .

Mokkadem, A. (1999). Cause de Dégradation des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie. *Vie et Nature* , 7, pp. 24–26.

Morales R., (1997). Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area. *Lagascalia*, 19, 249-262.

O

Organisation mondiale de la Santé (OMS). (2003). *Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales*. Genève, Suisse, 96 p.

P

Padrini F. ;Lucheroni M.T. (1996) : le grand livre des huiles essentielles .Ed .de Vecchi,

Q

Quezel P. et Santa S., (1963). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris.

R

Revenchon.E, (2008). « Supercritical fluid extraction and fabrication of essential oils and related products », the journal of supercritical fluids, 1997 ,10 ,1-37Office fédéral de la santé publique. “Les Huiles Essentielles.”. Confédération suisse,

Richard H., Benjilali B., Bauquour N., Baritoux O., (1985). Etude de diverses huiles essentielles de thym du Maroc. *Lebensm-Wiss U-Technol*.

S

Saxena, K. (1997). Antimicrobial Screening of Selected Medicinal Plants from India. *Journal of Ethnopharmacology* , 58 (2), pp. 75-83.

Références bibliographiques

Schwartz R., Davis R & Hilton T.J. (1992) - Effect of temporary cements on the bond strength of resin cement. *Am. J. Dent.*, 5(3) : 147-150.

Smith M. D. et Navilliat P.L., (1997). A new protocol for antimicrobial testing of oils. *Journal of Microbiological Methods*, 28, 21-24.

Suffredini, J. B., Sader, H. S., Goncalves, A. G., Reis, A. O., Gales, A. C., Varella, A. D., et al. (2004). Screening of antimicrobial extracts from plants native to the Brazilian Amazon rainforest and Atlantic forest. *Brazil. J. Med. Biol. Res* , 37, pp. 379-384.

Stahl-Biskup E., (2002). Thyme: The genus *Thymus*. Ed. Taylor & Francis, London.

V

Valnet J.(1974) - Phytothérapie et aromathérapie : nouvelles observations. *Plantes Médicinales et phytothérapie.*, 8 : 229-236.

Valnet J. (2000). Aromathérapie. Ed. Maloine S. A.alteration of saccharomyces cerevisiae. *Phytother. Res.* 19(5), 405-8.

Valnet J., (2005). L'aromathérapie. Ed. Maloine S.A. 633p

Viaud H., 1993. Cité par Michel Van hove. Aromathérapie. [www.nature helps .com/France/Viaud 2. htm](http://www.naturehelps.com/France/Viaud2.htm).

W

Wang Z.N. et Coley-Smith J.R., (1986). Studies some characteristics of dicarboximide resistant

isolates of *Botrytis cinerea* from protected lettuce. *Plant Pathol*, 35, 544-550

Willcox, J. K., Ash, S. L., & Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* , 44 (4), pp. 275-295.

Wicht M et Anton R. (2003). Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science

Références bibliographiques

et thérapeutique. 2^{ème} édition. Ed. TEC et DOC. Lavoisier. pp : 523-525.

X

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

Z

Zaouali.Y., Bouzain.T., Boussaid.M, (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis L.* varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities, Food and Chemical Toxicology 48 ,3144–3152

Zaika L.L., (1988). Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its Determination. *Journal of Food Safety*, **9**, 97-118.

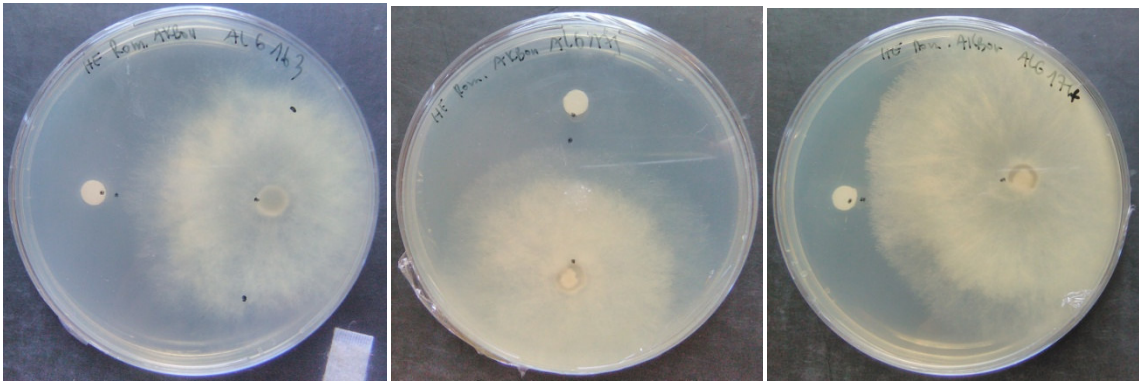
Zlotorzynski A. (1955): Microwaves assisted extraction of essential oils from vegetal material. *Anal . Chem* .25(1), p : 43-76,.

Annexes

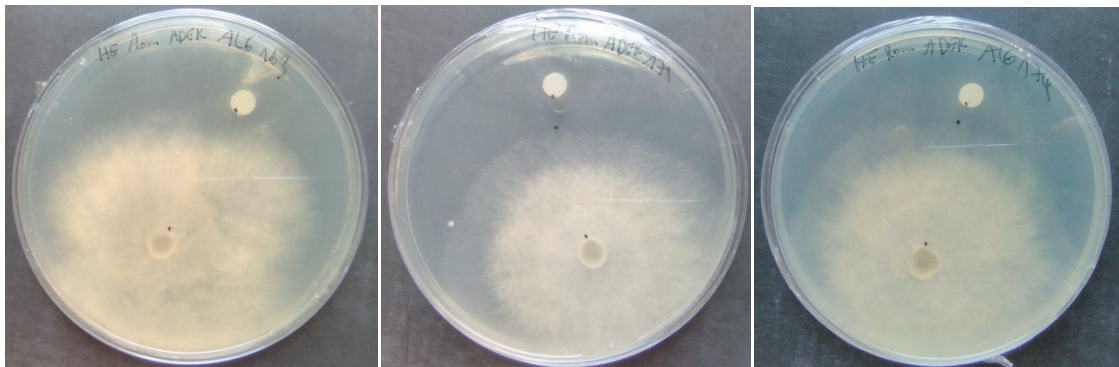
Annexes



**Annexes 1 : Taux d'inhibition moyens de croissance mycélienne de *B.cinerea*
(ALG 163, ALG 171, ALG 174) traitée avec l'HE du Thym**

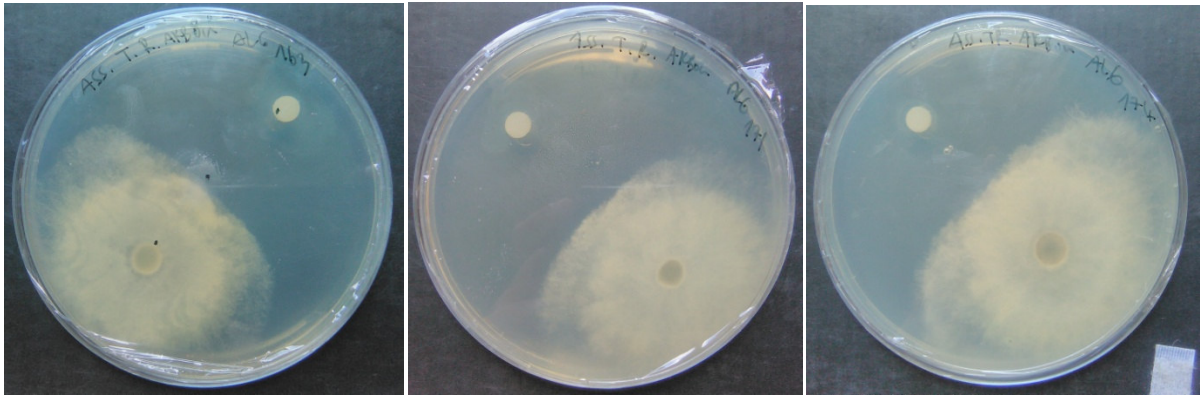


**Annexes 2 : Taux d'inhibition moyens de croissance mycélienne de *B.cinerea*
(ALG 163, ALG 171, ALG 174) traitée avec l'HE. Ros.Ak**

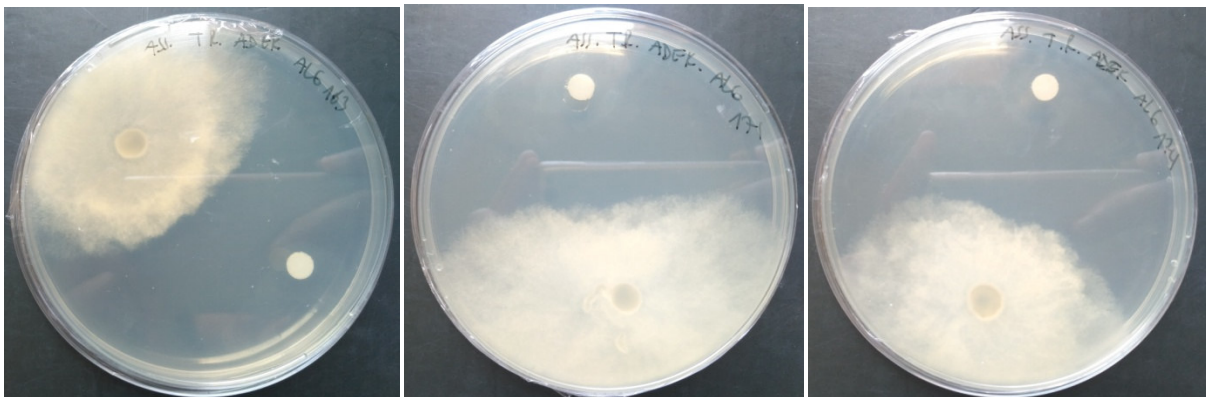


**Annexes 3 : Taux d'inhibition moyens de croissance mycélienne de *B.cinerea*
(ALG 163, ALG 171, ALG 174) traitée avec l'HE. Ros.Ad**

Annexes



**Annexes 4: Taux d'inhibition moyens de croissance mycélienne de *B.cinerea*
(ALG 163, ALG 171, ALG 174) traitée avec l'HE AS.Th.Ros.Ak**



**Annexes 5 : Taux d'inhibition moyens de croissance mycélienne de *B.cinerea*
(ALG 163, ALG 171, ALG 174) traitée avec l'HE AS.Th.Ros.Ad**

Annexes

Résumé

Notre étude a pour objectif de déterminer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites par hydrodistillation de deux plantes médicinales : *Thymus munbyanus* et *Rosmarinus officinalis* récolté dans la wilaya de Bejaia. Les rendements d'extraction obtenus varient entre 2,05 et 3,47 %. L'évaluation des activités antibactérienne et antifongique ont été mises en évidence par la méthode des aromatogrammes *vis-à-vis* cinq souches bactériennes (*Dickeya solani*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*), et par confrontation directe contre trois isolats de *Botrytis cinerea*. Les résultats des activités antimicrobiennes ont montré que l'huile essentielle du thym présente une bonne activité inhibitrice par rapport au romarin. L'activité antifongique nous a révélé que l'huile essentielle de *Thymus* a présenté une bonne activité envers les souches fongiques cibles comparée avec l'HE du *Rosmarinus officinalis*. L'association entre l'HE de thym et le romarin (des deux régions) à montré une interaction antagonisme.

Mots clés : Huile essentielle ; Activité antibactérienne ; Activité antifongique ; *Rosmarinus officinalis* ; *Thymus munbyanus*.

Abstract

Our study aims to determine the antimicrobial activity of essential oils extracted by hydrodistillation of two medicinal plants: *Thymus munbyanus* and *Rosmarinus officinalis* harvested in the wilaya of Bejaia. The extraction yields obtained vary between 2.05 and 3.47%. The evaluation of antibacterial and antifungal activities was demonstrated by the aromatograms method against five bacterial strains (*Dickeya solani*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*), and by direct confrontation against three isolates of *Botrytis cinerea*. The results of the antimicrobial activities showed that the essential oil of thyme has a good inhibitory activity compared to rosemary. Antifungal activity revealed that *Thymus* essential oil showed good activity towards target fungal strains compared with *Rosmarinus* EOs. The association between the thyme EO and rosemary (from both regions) showed an antagonistic interaction.

Key words: Essential oil, Antimicrobial activity; Antifungal activity; *Rosmarinus officinalis* ; *Thymus munbyanus*.