



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université Echahid Cheikh Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème :

**Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de
l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Thymus
vulgaris* de la région de Tébessa**

Présenté par:

M^{elle} Amri Assia

M^{elle} Hadfi Chaima

Devant le jury:

Dr. FENGHOUR . H	MCA	Université de Tébessa	Promotrice
Pr. BOUABIDA .H	MCA	Université de Tébessa	Présidente
Dr. SGHIR . H	MCB	Université de Tébessa	Examinatrice

Année universitaire : 2022 / 2023



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université de Echahid Cheikh Larbi Tébessi –Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème :

**Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de
l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Thymus
vulgaris* de la région de Tébessa**

Présenté par:

M^{elle} Amri Assia

M^{elle} Hadfi Chaima

Devant le jury:

Dr. FENGHOUR . H	MCA	Université de Tébessa	Promotrice
Pr. BOUABIDA .H	MCA	Université de Tébessa	Présidente
Dr. SGHIR . H	MCB	Université de Tébessa	Examinatrice

Année universitaire : 2022 / 2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي
خَلَقَ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ
وَالَّذِي جَعَلَ الْمَوْتَ
وَالْحَيَاةَ وَالَّذِي
يُعِيدُ النَّاسَ
وَالَّذِي يُدَبِّرُ
الْأَمْرَ وَاللَّهُ
بِشَيْءٍ عَظِيمٍ

Remerciement

Nous remercions Allah ,le Clément ,le Miséricordieux qui nous a donné la patience ,l'énergie et la volonté afin de finaliser ce travail.

*D'abord , nous tenons vivement à exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude à notre encadreur **Dr.Fenghour Hind** pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique.*

Ainsi que pour sa grande patience et sa gentillesse jusqu'à la fin de ce mémoire .

*Un grand remerciement à Mademoiselle **Bourahla Nour Al-Huda** pour son aide et sa gentillesse nous avons souhaitons à tous bonheur et générosité.*

*Nous adressons notre sincère remerciement à **Dr.Hanane** et **Pr. Bouabida Hayette** qui ont fait l'honneur d'être dans les jurys de notre soutenance .*



Dédicace

Je dédie mon travail à :

*La lune de mes nuits et le soleil de mes jours ,à celle qui m'a toujours soutenu :ma chère mère **Saliha** pour tous leurs sacrifices ;leur amour, leur tendresse, leur soutiens et leur prières tout au long de mes études.*

*À la source de ma volonté à mon cher père **Khamissi** qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études ,pour son sacrifices ,ses conseils et ses encouragements. Je ne cesserai jamais de remercier mon dieu pour m'avoir donné une mère et un père comme vous puisse dieu vous protéger Inchallah.*

*À mes chers frères :**Bilal** et **Abd alrahman** et le meilleur frère **Ismail** qui me manque .Dieu le garde Inchallah.*

*Mes adorables sœurs :**Aicha** et **Khawla**.*

*À mon cher Encadreur **Dr.Fenghour hind** merci pour votre patience, vos efforts intenses, et votre disponibilité permanente.*

*À mes meilleures amies **Dakhli Chirihene** et **Bouguera Doua** q'ont toujours avec moi merci beaucoup mes copines d'enfance.*

À tous mes professeurs du primaire jusqu'au niveau universitaires.

Sans oublier mes amies de la promotion 2022/2023 Master 2 Microbiologie Appliquée .Et tous ceux qui ont un jour compté dans ma vie.

ASSIA





Dédicace

Avant tout chose, je remercie le DIEU, le tout puissant pour m'avoir donné la force et la patience .A la femme la plus courageuse, sensible, généreuse, à celle qui a sue me donner amour et joie de vivre, à celle qui a toujours montrée affection et compréhension à mon égard ,ma mère Rebh que j'aime.

A mon cher père, au plus beau des pères, que Dieu ait pitié de toi et te fasse habiter son vaste paradis .

A ceux qui m'ont aidé et m'ont donné joie et bonheur :

Mes frères Khalil ,Anoir, Hamdi,Oussema et Salah .

Mes sœurs Linda et Raja

A mon encadreur Madame Fenghour Hind, la meilleure encadreur

A MON BINOME Assia pour sa présence, son soutien et son aide permanente , merci beaucoup ma chérie.

A toute la promo Microbiologie

A ceux que j'ai eu la chance de connaître, dans les meilleurs et pires moments de ma vie.

A tous ceux que j'aime, à tous ceux qui m'aiment, je dédie ce modeste travail.



CHAIMA

Résumé

Cette étude consiste à évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique obtenue à partir d'une plante médicinale *Thymus vulgaris* jugée par la médecine traditionnelle avoir un grand effet anti-infectieux. Ceci afin de rationaliser leur usage pour les appliquer comme remède alternatif aux antibiotiques face à l'émergence de multi-résistance bactérienne et à l'échelle de l'antibiothérapie. L'extrait méthanolique de cette plante qui a montré un rendement de 18.58 ml/g a été testé sur 5 souches bactériennes pathogènes : *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*, *Serratia marsescens* et *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. Des propriétés antibactériennes intéressantes de l'extrait méthanolique ont été constatées sur toutes les bactéries testées ainsi que la CMI et CMB égale 3.12 mg/ml pour les bactéries à Gram – et 0.79 pour les bactéries à Gram +. ainsi qu'une activité bactéricide importantes. Il n'y a pas une différence entre les valeurs de CMI et CMB des souches testées. Par conséquent et sur la base de ces résultats prometteurs, on peut proposer l'usage de cette substance naturelle en tant qu'agents antibactériens en industrie pharmaceutiques comme alternatif thérapeutique.

Mots Clés :Extrait méthanolique, *Thymus vulgaris*, Activité antibactérienne, CMI,CMB, bactéricide.

Abstract

This study consists of evaluating the antibacterial activity of the methanole extract taken from a medicinal plant *Thymus vulgaris* that traditional medicine judges to have a significant anti-infective effect, in order to rationalize its use for its application as an alternative treatment to antibiotics in the face of the emergence of multi-resistant bacteria and the scope of antibiotic therapy. The methanolic extract of this plant which showed a yield of 18.58 mL/g was tested on 5 pathogenic bacterial strains: *Klebseilla pneumonia*, *E.coli*, *Serratia marsescens* et *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus épidermidis*

The antibacterial properties of the methanolic extract were observed on all bacteria tested as the CMI and CMB were equal to 3.12 mg/mL for Gram- bacteria and 0.79 for Gram + bacteria. In addition to the significant bactericidal activity, there is no difference between the CMI and CMB values of the tested strains. Therefore, based on these promising results, we can propose the use of this natural substance as antibacterial agents in the pharmaceutical industry as a therapeutic alternative.

Keywords: methanolic extract, *Thymus vulgaris*, antibacterial activity, CMI, CMB, bactericidal

الملخص

تتكون هذه الدراسة من تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص الميثانولي المأخوذ من نبات طبي *Thymus vulgaris* يحكم الطب التقليدي أنه له تأثير كبير مضاد للعدوى ، وذلك من أجل ترشيد استخدامها لتطبيقها كعلاج بديل للمضادات الحيوية في مواجهة ظهور البكتيريا المتعددة المقاومة وعلى نطاق العلاج بالمضادات الحيوية. تم اختبار المستخلص الميثانولي لهذا النبات والذي أظهر محصول 18.58 مل / جم على 5 سلالات بكتيرية ممرضة: *Klebsiella pneumoniae* و *E.coli* و *Serratia marsescens* و *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidis*. لوحظت الخصائص المضادة للبكتيريا للمستخلص الميثانولي على جميع البكتيريا المختبرة حيث أن MIC و CMB تساوي 3.12 مجم / مل للبكتيريا الجرام - و 0.79 للبكتيريا الجرام +. بالإضافة إلى نشاط مبيد للجراثيم معنوي لا يوجد فرق بين قيم MIC و CMB للسلالات المختبرة.

لذلك ، وبناءً على هذه النتائج الواعدة ، يمكننا اقتراح استخدام هذه المادة الطبيعية كعوامل مضادة للبكتيريا في صناعة الأدوية كبديل علاجي.

الكلمات المفتاحية: مستخلص ميثانولي *Thymus vulgaris* ، نشاط مضاد للبكتيريا ، CMI ، CMB ، مبيد الجراثيم.

Listes des figures

Numéro de figure	Titre	Page
Figure 1	Structure chimique des alcaloïdes.	10
Figure 2	Structure à base des flavonoïdes et leurs classes.	12
Figure 3	Structure d'un tannin hydrolysable.	14
Figure 4	Structure d'un tannin condensé.	14
Figure 5	Structure d'une saponine.	16
Figure 6	Structure chimique de Anthraquinones.	16
Figure 7	Les feuilles de <i>Thymus vulgaris</i> avant et après le broyage.	25
Figure 8	Macération de <i>Thymus vulgaris</i> .	28
Figure 9	La filtration de l'extrait méthanolique. de <i>Thymus vulgaris</i> .	29
Figure 10	Évaporation de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> .	30
Figure 11	Diagramme de l'extraction méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> .	31
Figure12	Préparation de la solution mère de l'extrait méthanolique.	35
Figure 13	Préparation des disques.	35
Figure 14	Préparation de l'inoculum.	36
Figure 15	Étapes de préparation des dilutions .	37
Figure 16	Écoulement du milieu de culture MH.	37
Figure 17	Ensemencement des bactéries sur MH.	38
Figure 18	Dépôts des disques sur la surface de la gélose.	38
Figure 19	Imprégnation des disques et incubation dans l'étuve à 37°C pendant 24h	39
Figure 20	Microplaque pour la détermination de la CMI et CMB.	40
Figure 21	Suspensions bactériennes .	40
Figure 22	Solution mère de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> ..	40
Figure 23	Dépôts de 100 µL bouillon MH dans les puits de la microplaque	41
Figure 24	Ajout de 100 µL de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> .	41

Figure 25	Ajout de 10 μL de l'inoculum bactérien.	42
Figure 26	Incubation de la microplaque à l'étuve à 37°C pendant 24h.	42
Figure 27	Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>E.coli</i>.	54
Figure 28	Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>Serratia marsescens</i>.	54
Figure 29	Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>Klebsiella pneumoniae</i>.	55
Figure 30	Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i>.	55
Figure 31	Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>Staphylococcus épidermidis</i>.	55
Figure 32	Détermination CMI pour les souches bactériennes testées Gram + et Gram – .	56
Figure 33	Concentrations minimales bactéricides de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> chez les bactéries à Gram négatifs.	58
Figure 34	Concentrations minimales bactéricides de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> chez les bactéries à Gram positifs.	58

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 01	Classification de <i>Thymus vulgaris</i>.	04
Tableau 02	Composition chimique de <i>Thymus vulgaris</i>.	06
Tableau 03	Distribution géographique de <i>Thymus vulgaris</i>.	07
Tableau 04	Tableau descriptif des différentes souches bactériennes testées.	33
Tableau 05	Tableau descriptif des milieux de culture utilisés.	34
Tableau 06	Résultats des rendements de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulagris</i>.	45
Tableau 07	Résultats de screening phytochimique de <i>Thymus vulgaris</i>.	46
Tableau 08	Aspect microscopiques et macroscopique aux milieux sélectifs des souches bactériennes testées.	50
Tableau 09	Sensibilité des souches en fonction des zones d'inhibition	52
Tableau 10	Effet des différents concentrations de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance des bactéries Gram- et Gram+ .	57
Tableau 11	Valeurs des CMI et CMB et rapport caractéristique del'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> .	59

Liste des abréviations :

DMSO	Diméthylsulfoxyde
%	Pourcentage
±	Plus ou moins
µL	Microlitre
BMH	Bouillon Mueller Hinton
BN	Bouillon nutritif
C°	Degré Celsius
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
E.coli	Escherichia coli
G	Gram
g	Gramme
G-	Gram négatif
G+	Gram positif
GN	Gélose nutritif
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
mg	Milligramme
MH	Mueller Hinton
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Table de matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
ملخص	
Liste des figures	
Listes des tableaux	
Listes des abréviations	
Introduction	
I-1-Généralité de <i>Thymus vulgaris</i>	04
I-1-2-Nomenclature de <i>Thymus vulgaris</i>	04
I-1-3-Classification <i>Thymus vulgaris</i>	04
I-1-4-Description morphologique de <i>Thymus vulgaris</i>	05
I-1-5Composition biochimique de <i>Thymus vulgaris</i>	05
I-1-6-Répartition de l'espèce de <i>Thymus vulgaris</i>	06
I-1-7-Domains d'usage de <i>Thymus vulgaris</i>	08
I-2-Métabolites secondaires	10
I-2-1-Classification des métabolites secondaires	10
I-2-1-1-Les alcaloïdes	10
I-2-1-2-Les terpènes et stéroïdes	11
I-2-1-3-Les composés phénoliques	11
I-2-1-3-1-Les flavonoïdes	12
I-2-1-3-2-Les tannins	13
A) Tannins hydrolysables	13
B) Tannins condensés	14
I-2-1-3-3-Les saponosides	15
I-2-1-3-4-Les quinones	16
Dd ;II-1-Objectif de Travail	25
II-2—Matériel	25
II-2-1-Matériel végétale	25
II-2-1-1-Méthodes	25
II-2-1-1-Screening phytochimique	26

II-2-1-1-1-Les flavonoïdes	26
II-2-1-1-2-Les saponines	26
II-2-1-1-3- Les tannins	26
II-2-1-1-4-Les quinones	27
II-2-1-1-5-Les stéroïdes et les terpènes	27
II-2-1-1-6-Les alcaloïdes	27
II-2--1-2-Préparation de l'extrait méthanolique. de <i>Thymus vulgaris</i>	28
II-2-1-2--1-Détermination du rendement de l'extrait méthanolique. de <i>Thymus vulgaris</i>	32
II-2-2-Milieus de culture.	34
II-2-2-1-Méthode .	34
II-2-2-1-1-Revivification des souches bactériennes.	34
II-2-2-1-2-Verification de la pureté des souches.	34
II-2-2-1-2-1-Repiquage sur les milieux sélectifs	34
II-2-2-1-3-Évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique. de <i>Thymus vulgaris</i> par méthode d'Aromatogramme.	34
II-2-2-1-3-1-1-Préparation de la solution mère.	35
II-2-2-1-3-2-Préparation des disques.	35
II-2-2-1-3-3-Préparation de l'inoculum.	36
II-2-2-1-3-4-Préparation des dilutions.	36
II-2-2-1-3-5-Ensemencement et dépôts des disques.	37
II-2-2-1-3- Évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique. de <i>Thymus vulgaris</i> par méthode de microdillution.	39
II-2-2-1-3-1-Détermination de concentration minimale inhibitrice(CMI).	39
II-2-2-1-3-2-Détermination de concentration minimale bactéricide(CMB).	43
III-1-Rendement de l'extrait méthanolique.	45
III-2-Résultats et discussions de screening.	46
III-3-Confirmation de la pureté des souches bactériennes étudiées.	50
III-4--Évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique. de <i>Thymus vulgaris</i> par méthode d'Aromatogramme.	52
III-5- Évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> par méthode de microdillution.	56
III-5-1- Détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI).	56

III-5-2- Détermination de concentration minimale bactéricide(CMB).	59
Conclusion.	
Référence bibliographique.	
Annexes.	

Introduction

Introduction

Depuis l'apparition de la vie sur la terre, les plantes étaient un moyen pour se nourrir ,mais avec l'apparition des maladies, l'homme a découvert les vertus thérapeutiques des plantes médicinales qui ont été utilisées pour soulager et guérir toutes sorte de maladies sans savoir les molécules responsables de la guérison.

Aujourd'hui encore, la science confirme les différentes vertus des plantes aromatiques et de leurs huiles essentielles et leurs extraits bruts dont les domaines d'application sont très variés et qui sont très utilisés dans les industries alimentaires comme additifs et dans les cosmétiques, les parfumeries, les industries de savon et de détergents en volume impressionnant. Elles rentrent également dans la composition de plusieurs médicaments, sous forme de crèmes, gélules et suppositoires. **(Bellamine, 2007)** .

La science moderne a pu préciser le secret thérapeutique des plantes ; ce sont les métabolites secondaires ; dont Environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes : digitaline, quinine, morphine, colchicine, artémisinine... Pourtant ,moins de la moitié des plantes aujourd'hui ont été étudiées pour leurs propriétés thérapeutiques **(Takahashi et al., 2004)**. Actuellement le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et les troubles sanitaires des agents antimicrobiens ont puisés les chercheurs à retourner vers la médecine traditionnelle en utilisant des agents antimicrobienne d'origine naturelle tels que les huiles et les extraits.

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre '*Eucalyptus*, ce dernier est d'origine Australien mais il a été introduit en Algérie en 1850 par les français **(Ibrahim et al.,2016)** ; il est très connu par leur richesse en métabolites secondaires et leur pouvoir thérapeutique surtout pour les bronchites chroniques, toux, catarrhes bronchiques, rhume, grippe, asthme, catarrhe vésical, affections purulentes de l'urètre et du vagin **(El mansouri, 2013)** ; plusieurs études ont été faite sur plusieurs espèces d'*Eucalyptus* en ce qui concerne l'étude phytochimique ou biologique **(Vasantharaj etal, 2013)** .Dans cet optique, nous avons réalisé notre travail dont les objectifs visent à :

Introduction

- L'extraction des composés phénoliques par macération dans le méthanol des poudres des feuilles de la plante choisie.

-L'évaluation de l'activité antibactérienne in vitro des extraits sur des bactéries à Gram positif et négatif.

-La détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides pour les extraits.

Notre travail de recherche comporte deux parties ; la première partie représente une étude bibliographique avec deux chapitres sur la plante *Eucalyptus camaldulensis* ; les métabolites secondaires et l'activité antibactériennes de la plante.

La deuxième partie présente le matériel et les méthodes d'extraction et l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques ainsi que la présentation des résultats obtenus et leurs discussions. En fin, une conclusion générale comporte les principaux résultats obtenus.

*Synthèse
bibliographique*



Thymus vulgaris

I-1-Généralité :

Le genre *Thymus*, membre de la famille des Lamiacées, contient environ 400 espèces de plantes aromatiques vivaces, plantes herbacées sempervirentes ou semi-sempervirentes avec nombreuses sous-espèces, variétés, sous-variétés et formes (Borugă et al.,2014).L'espèce le plus connu c'est le *Thymus vulgaris*.

Thymus vulgaris est une espèce aromatique et médicinale de la famille des Lamiacées Originaires des régions méditerranéennes et a été adaptée à de nombreux climats différents à travers le monde (Fani et Kohanteb, 2017).

I-1-2- Nomenclature:

Thymus vulgaris a été ainsi nommé par Carl Von Linné en 1753 et reste le nom utilisé par toutes les nomenclatures scientifiques. C'est une plante des pharmacopées méditerranéennes. Il a la particularité de présenter une diversité de chémotypes très importante, ce qui lui confère ainsi une grande variété de constituants médicinaux. Les noms vernaculaires de l'espèce *Thymus vulgaris* sont les suivants : En Arabe : Zaitra, zaatar ; en Tamazighth : Azukni, Tazuknite, (Bel-malha et al., 2015)

I-1-3-Classification : la situation botanique de l'espèce *thymus vulgaris* est donnée selon (Dauqan et Abdullah,2017).

Tableau 01 :Classification de *Thymus vulgaris* (Dauqan et Abdullah,2017).

Domaine	Plantae
Sous- domaine	<i>Tracheobionta.</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Super division	<i>Magnoliophyta</i>
Division	Mognoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae

Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus vulgaris</i>

I-1-4- Description morphologique :

La plante *Thymus vulgaris* est un arbuste buissonnant à base ligneuse, de 10 40 cm (**Fani EtKohanteb, 2017**), avec des tiges dressées, ligneuses, très rameuses. Les feuilles sont Petites, opposées à bord enroulé, subsessiles, blanchâtre, sur le dessous, à limbe coriace. Les fleurs sont petites, mauves, zygomorphes, en glomérules ovoïdes. La plante présente une forte Odeur persistante de thymol. Le fruit est un tétrakène à quatre nucules brun. (**Bruneton , 2016 ;Boulade, 2018**).

I-1-5-Composition biochimique :

Thymus vulgaris est composée d'une quantité très variable en phénols dont le thymol et le carvacrol sont les majeurs constituants. Elle contient également d'autres composants minoritaires comme présentés dans le tableau 1 suivant (**Abdelli, 2017**).

Tableau 02: Composition Chimique de *Thymus vulgaris*(Abdelli,2017).

Espèces	Famille	Compositions
<i>Thymus vulgaris</i>	Phénols (20-80%)	Thymol (30-70%)
		Carvacrole (3-15%)
	Alcools	Linalool (4-6.5%)
		α -terpinéol (7.8 – 8.9%)
	Monoterpènes Hydrocarbonés	p-cymène (15 – 20%)
		γ -terpinène (5 – 10%)
		bornéol, camphre, limonène, myrcène, β -pinène, transsabinène hydrate et terpinène-4-ol (0.5 – 1.5%)
	Sesquiterpènes Hydrocarbonés	β -caryophyllène (1 – 3%)

Par ailleurs, l'espèce *Thymus vulgaris*, est très connue pour son polymorphisme chimique. En effet, elle est représentée par au moins sept chémotypes différents, définis en fonction du constituant principal de son huile essentielle. Deux ont une structure phénolique : thymol et carvacrol et cinq ont une structure non phénolique : géraniol, α -terpinéol, thuyanol-4, linalool et 1,8- cinéole. Cette variabilité chimique dépend de plusieurs facteurs, quisont généralement d'ordres climatiques, environnementaux, génétiques, saisonniers (Abdelli, 2017).

I-1-6- Répartition de l'espèce de *Thymus vulgaris* en Algérie :

La répartition de l'espèce *Thymus vulgaris* en Algérie et selon différentes études est représentée dans le tableau 3.

Tableau 03: Distribution géographique de *Thymus vulgaris* en Algérie

Wilaya	Partie utilisée	Références
Mostaganem	Feuilles +fleurs	Abdelli, 2017 Benmadi et Abida, 2018
Naama	Feuilles +fleurs	Benmadi et Abida, 2018
M'sila	Feuilles	Binate et Dikes , 2018
Tlemcen	Feuilles	Abdelli, 2017
Bouira	Feuilles, tiges et fleurs	Belgaid et Rahmani, 2018
Alger	Tige +feuilles	Boukhatem et al., 2014
Ain defla	Partie aérienne.	Ghomari et al., 2013
Relizane	feuilles + tige	Djrourou et Habouchi, 2018
Tipaza	Feuilles et tiges	Zaid et Tifourghi, 2020
Souk-Ahras	Feuilles	Bouzabata, 2015
Boumerdès	partie aérienne	Oulebsir-Mohandkaci et al., 2015
Ghardaïa	Partie arienne	Kemassi et al., 2014
Sétif	Toute la plante	Nedjai et Nedjai , 2017

I-1-7- Les domaines d'usage de *Thymus vulgaris* :

A) Usage traditionnelle :

Les espèces de *Thymus* sont considérées comme des plantes médicinales en raison de leurs propriétés pharmacologiques et biologiques. Le Thym est l'une des plantes les plus utilisées comme extraits à fort pouvoir antibactérien et anti-inflammatoire dans la pharmacopée traditionnelle (**Lalami et al., 2013 ; Labiad et al., 2017**).

Le Thym est l'une des plantes les plus utilisées comme épices et extraits à fort pouvoir antibactérien et anti inflammatoire dans la pharmacopée traditionnelle (**El Ouali Lalami et al. 2013 ; Labiad et al. 2017**). En médecine traditionnelle, cette espèce est très utilisée sous plusieurs formes : Les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, et le rhume, en tisane tonique, en décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et gastrites, en usage externe comme cicatrisants et antiseptiques. Les feuilles de Thym sont riches en huile essentielle dont les propriétés sont mises à profit en phytothérapie (**El Ouali Lalami et al. 2013 ; Ghelichnia 2016 ; Labiad et al. 2017**).

b) Usage en thérapie et en pharmacologie :

Grâce à ses diverses propriétés importantes, le thym possède un large spectre d'utilisations, parmi lesquelles on peut citer :En raison de ses effets notables pour soulager les spasmes gastro-intestinaux, la stomatite et aussi l'expulsion des gaz intestinaux, les nausées de mauvaise digestion, l'inflammation des gencives, le *Thymus* est également recommandé comme un régulateur de l'estomac (**Ahmed, et al., 2016 ; Carrió, et Vallès, 2012**)

Son usage est très reconnu comme désinfectant dermique, soulage les blessures cutanées superficielles, les plaies, traitement de l'inflammation de la peau, l'acné et l'eczéma (**Gilca et al., 2018**).

Notamment, les plantes de *Thymus* ont été appliquées pour le traitement des maladies

rénales telles que les calculs rénaux, l'infection urinaire et pour un effet diurétique (**Alarcon, et al., 2015**).

Le thym est très antiseptique et est utilisé à ce titre pour soigner les infections pulmonaires. Il est spasmolytique et calme les toux. Il est actif sur la rhinorrhée car il diminue les sécrétions nasales. Mise part son activité pulmonaire, le thym s'utilise aussi contre les problèmes intestinaux, il soigne les ballonnements. Son action antiseptique s'exerce également sur le système digestif et notamment en cas de diarrhée. **(Mouhi, 2017).**

Des extraits de thym ont été utilisés en médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies respiratoires comme l'asthme et la bronchite et pour renforcer le système cardiaque. **(Dauqan et Abdullah, 2017).**

c) En cosmétique :

D'autre part, il entre dans la composition des produits cosmétiques. Son HE riche en thymol est couramment utilisée pour la confection de savons, des produits de beauté, des parfums, détergents et articles de toilette, produits d'hygiène, et d'autres produits, ainsi que les HEs de thym lutteraient contre la perte de cheveux **(Saidj, 2007 ; Bentayeb et Djemmal,2014)** Prévenir la perte de cheveux et les poussées d'acné

I-7-Métabolites secondaires :

Les plantes médicinales renferment des principes actifs qui sont issus des métabolites secondaires ayant des propriétés physicochimiques d'intérêt médical thérapeutique et pharmacologique (**Rahmani, 2017**).

Les métabolites secondaires ne sont généralement pas considérés comme nécessaires à la vie végétale. Ils sont biosynthétisés à partir des métabolites primaires et jouent un rôle important dans l'interaction entre les plantes et leur environnement, contribuant ainsi à la survie des organismes dans leurs écosystèmes. Jusqu'à présent, plus de 8 500 métabolites secondaires sont connus à échelle mondiale (**Boudjerda, 2013**).

I-7-1-Classification des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires qui sont classés selon leur structure chimique en : alcaloïdes , terpénoïdes , composés phénoliques .

I-7-1-1- Les alcaloïdes :

Du point de vue biologique, les alcaloïdes sont des molécules très intéressantes car certaines constituent les principes actifs de plusieurs extraits de plantes qui étaient auparavant utilisés comme médicaments, poisons ou psychotropes. Ils sont insolubles ou extrêmement difficiles à dissoudre dans l'eau, par contre ils sont solubles dans l'alcool, l'éther, l'acide et l'ammoniac (**Aref, 2015**).

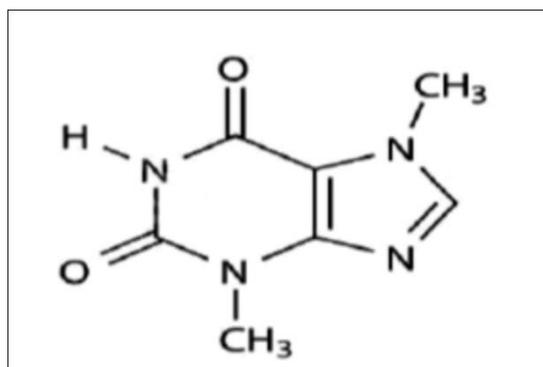


Figure 01 : Structure chimique des alcaloïdes (Bruneton,2009)

II-7-1-2-Terpènes et Stéroïdes :

Les terpènes ingrédients le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux, notamment les plantes supérieures. Ils sont également rencontrés dans les autres types d'organismes vivants (algues, mousse, mushrooms, insectes) (Guessoum, 2015). Leur spécialité structurée la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique (Boubekri, 2014). La plus importante des activités biologiques des triterpènes est celle d'anti-inflammatoire non-stéroïdienne (Grigoraş, 2012).

II-7-1-3- Les composés phénoliques :

Molécules chimiques constituées d'un noyau aromatique (noyau benzénique) auquel se lie un ou plusieurs groupements hydroxyles (OH), libres ou bien engagés dans une autre fonction ester, hétéroside, éther, etc (Lugasi et al., 2003 ; Sun et al., 2011 ; Kabran et al., 2014).

Ils ont divers Intérêts :

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'il existait une association inverse entre la morbi-mortalité cardiovasculaire et la consommation de produits riches en polyphénols tels que les fruits, les légumes, le vin rouge, le cacao et le thé (Auger et Schini-Kerth, 2014).

La prolifération cellulaire est un processus biologique dans lequel le nombre de

cellules augmente au fil du temps par la division cellulaire. Plusieurs études menées in vitro sur des lignées de cellules cancéreuses ou in vivo ont montré que les composés phénoliques ont des effets antiprolifératifs sur les cellules tumorales (**Rugina et al., 2017 ; Diaconeasa et al., 2017 ; Bano et al., 2020**).

Les acides phénoliques ont attiré l'attention en raison de leurs multiples bienfaits pour la santé, notamment leur activité antioxydante, anti-inflammatoire, anti-microbienne, anti-allergique, immuno-régulatrice et anticancéreuse (**Anantharaju et al., 2016 ; Kumar et Goel, 2019**).

II-7-1-3-1- Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des substances phénoliques qui représentent une grande classe de métabolisme secondaire. Leur structure se compose de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par trois chaînes carbonées, généralement organisés en un cycle hétérocyclique contenant de l'oxygène (**Karabinet al, 2015**). Il existe plus de 5 000 espèces de flavonoïdes identifiées, qui peuvent être classées selon leur structure et leur degré de substitution et d'oxydation (**Yao et al, 2004**). Les principaux flavonoïdes sont généralement divisés en six sous-catégories : flavonoïdes, flavonols, flavan3-ols, flavanones, isoflavones et anthocyanes (**Karabinet al, 2015**).

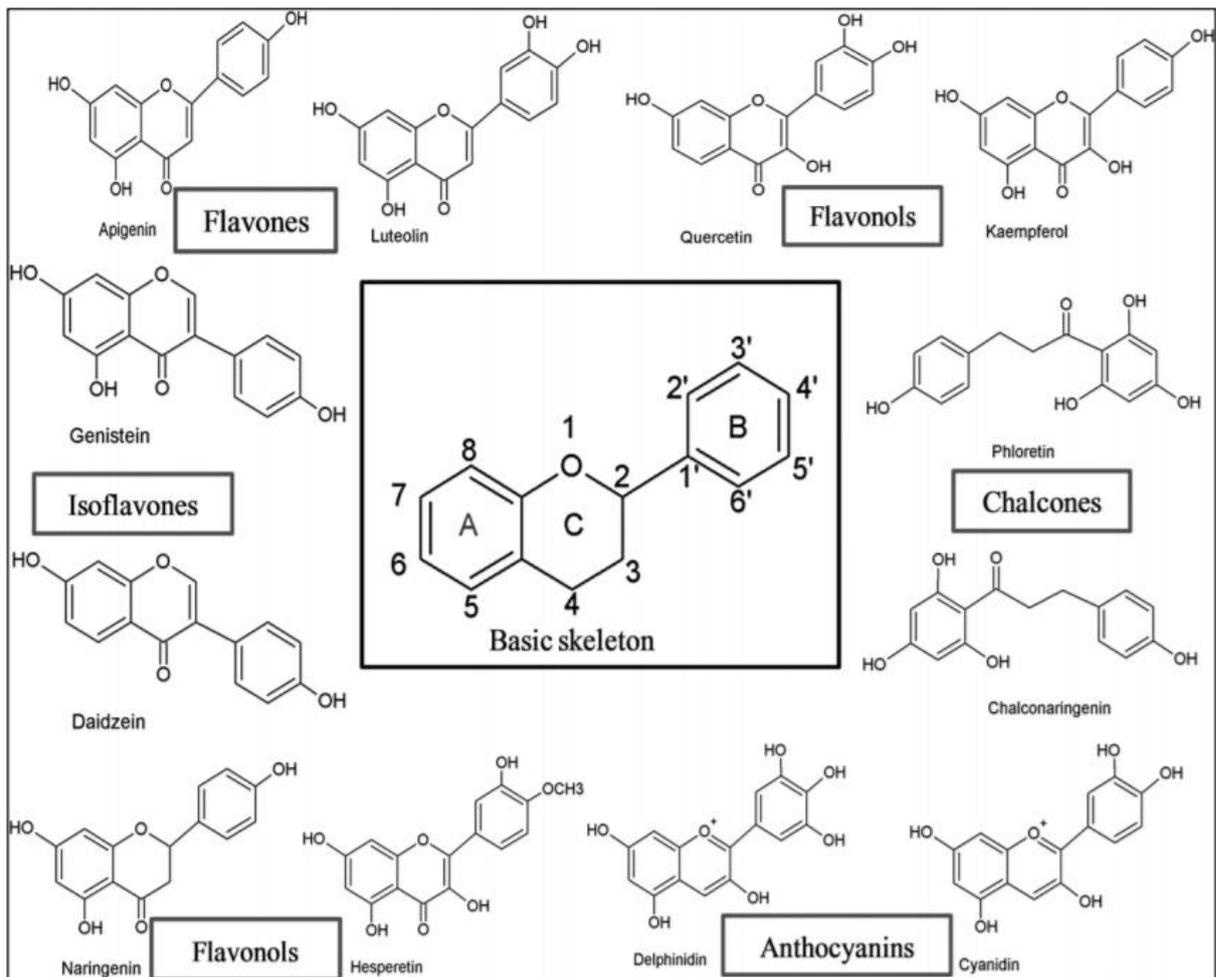


Figure 02 : Structure de base des flavonoïdes et leurs classes (Panches et al,2016)

II-7-1-3-2-Tanins :

Ils sont définis comme des composés hydrosolubles (polymères) polyphénoliques de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 KD, qui ont des propriétés de bronzage de la peau, c'est-à-dire de la faire pourrir (empêcher la carie), et sont liés aux propriétés des macromolécules (protéine) la capacité de se lier et de précipiter les alcaloïdes et la gélatine (Harrar, 2012).

Selon(Boudjouref ,2011) il existe deux types de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés, également appelés : proanthocyanidines

A) Tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont des polyesters d'hydrates de carbone et d'acides phénoliques. Ils sont facilement décomposés par la tannase en sucres et acides phénoliques, selon ses propriétés : tanins galliques et Ellagitanins

* Tanins galliques (Gallo tanins) : Ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.

* Tanins ellagique (Ellagitanins) : Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique.

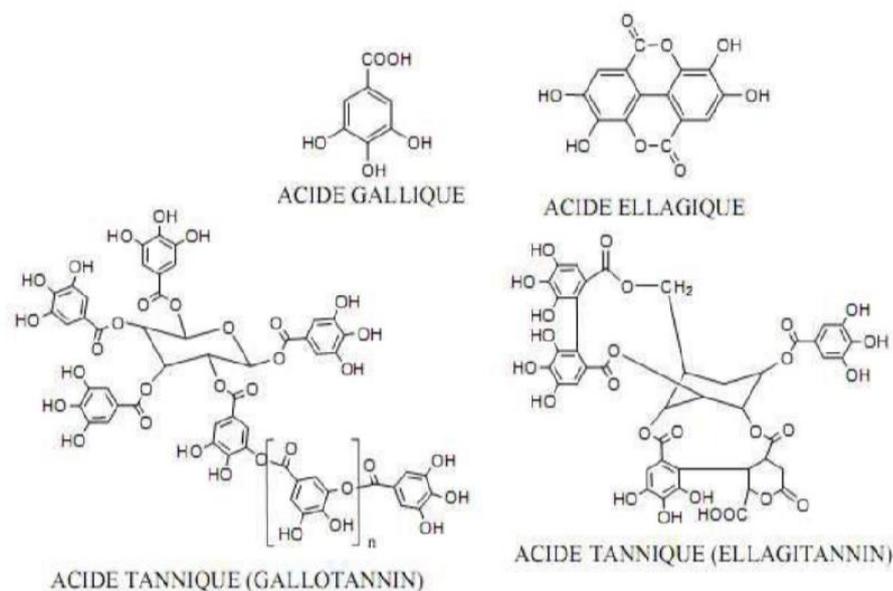


Figure 03: Structure d'un tanin hydrolysables (Peronny, 2005).

B) Tannins condensés :

Ce sont des proanthocyanidines. C'est-à-dire, des composés polyphénoliques hétérogènes: dimères, oligomères ou polymères de flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols. Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre. exemple tannin catéchique.

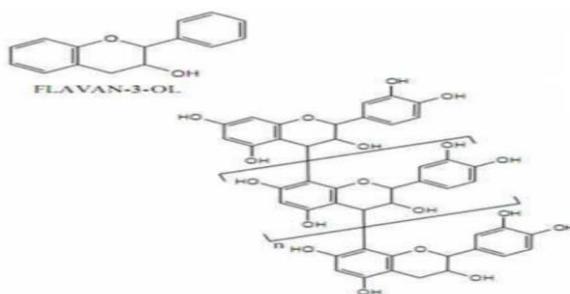


Figure 04 : Structure d'un tanin condensé (Peronny, 2005).

Certaines études menées sur les tannins, ont montré que la consommation régulière d'infusion à base de tannins pourrait considérablement réduire les incidences liées au cancer de l'estomac et du poumon, et ceci chez les individus des deux sexes (Rajasekar et al., 2021).

Il est également très intéressant de constater que les tannins condensés sont très actifs contre plusieurs souches microbiennes et ceci à très faible concentration. Ainsi, il a été rapporté que les tannins inhiberaient la prolifération bactérienne de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Shigella dysenteriae* et *Salmonella senftenberg* (Sieber et al., 2020).

II-7-1-3-3-Les saponosides :

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques, fréquemment rencontrés chez les végétaux supérieurs en particulier chez les Dicotylédones (racines, fruits, écorces, rétiges, feuilles en les en Le nom saponoside est dérivé du mot latin sapo qui veut dire savon, qui évoque le caractère moussant de leur solution aqueuse. Ce pouvoir tensio-actif est dû au caractère amphiphile des molécules, à la fois aphile des molécules, à la fois lipophile Water

(la partie osidique). Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés immunomodulation Adjuvant, cytotoxicity, anti-tumor and low cholestérol (**Kissoum et Khalfaoui, 2015**).

Les saponines participeraient également à la régulation du métabolisme lipidique et glucidique, précisément en réduisant les niveaux sanguins des lipides et du glucose (**Marrelli et al., 2016**)

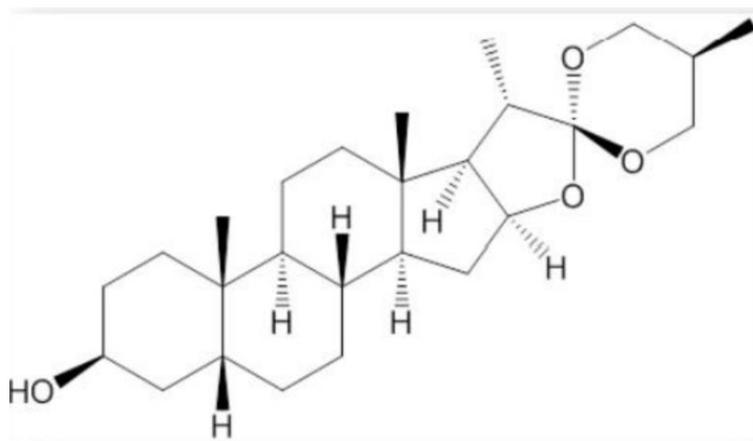


Figure 05 : Structure d'une saponine (sarsapogenine B), (**del Hierro et al,2018**)

II-7-1-3-4- Les Quinones :

Les quinones sont des composés organiques aromatiques jouant un rôle clé dans le processus de la photosynthèse (**Lu et al., 2013**).

Parmi les quinones les plus importantes, on retrouve le 1,4-naphtalènedione précurseur de la vitamine K1 dont le rôle principal est de renforcer les fonctions cardiovasculaires et d'éviter les hémorragies (**Van Ballegooijen et Beulens, 2017**).

Il a également été rapporté que les quinones pourraient protéger les diverses cellules du corps contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres, surtout de type ROS et NOS, grâce à leurs cycles redox rapides qui leur confère le potentiel de se lier aux groupes thiol, amine et hydroxyle (**Kruk et al., 2016**),

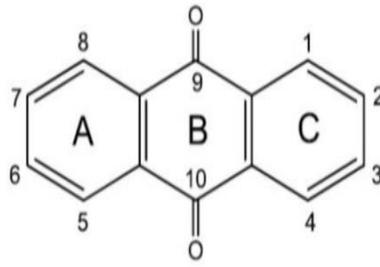


Figure06 :Structure chimique de Anthraquinones (Bertille,2011)

·
·

Matériels et Méthodes

II-1- Objectifs de travail

L'ensemble de ce travail a été effectué au sein du laboratoire de microbiologie du département de Biologie appliquée de la faculté des sciences exacte et science de la nature et de la vie, de l'Université Laarbi Tébessi de Tébessa du mois de Mars 2023 jusqu'au début de Mai 2023 .Le but de ce travail consiste à l'étude phytochimique de *Thymus vulgaris* afin de reconnaître quelques composés existantes ,ainsi que l'étude «In vitro» de l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* sur différents souches bactériennes provenant d'infection urinaire : *Klebsiellapeumoniae* ,*E.coli*, *Serratia marsescens* ;*Staphylococcus aureus* ,*Staphylococcus épidermidis* ,et enfin déterminer le pouvoir bactéricide ou bactériostatique de l'ExM après évaluation des CMI et CMB. Les souches bactériennes testés sont des souches pathogènes clinique proviennent de le laboratoire d'analyses médical privé Hannibal et laboratoire Elit L'abm de Tébessa.

II-2- -Matériels

II-2-1 Matériel végétale

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est les feuilles de *Thymus vulgaris* (**figure 01**) .Les échantillons ont été récoltés manuellement à partir de la région de Ain Zerga (Tébessa). Le séchage a été effectué naturellement à l'abri de la lumière et de l'humidité, à une température ambiante . La matière végétal a été broyé dans un moulin électrique en une poudre très fine (**figure 01**) , pour augmenter la surface d'échange entre le solide et le solvant et faciliter l'extraction. Par la suite la poudre a été conservée dans une boîte hermétique à l'abri de la lumière .



Figure 07: Les feuilles de *Thymus vulgaris* avant et après le broyage (photos

Personnelles, 2023)

II-2-1 -1-Screening phytochimique

II-2-1 -1-1-Flavonoïdes

Premièrement ,nous avons macérés 10 g de poudre de *Thymus vulgaris* dans 100 mL eau distillée bouillante pendant 30 minutes.après 30 minutes ,nous avons filtrés le mélange à l'aide d'une bande à gaz , le filtrat obtenu été soumis à le protocole de (Najjaa et al., 2017). avec quelques modifications .

Dans un tube à essai, ajouter 2 mL d'extrait et ajouter 0.5ml de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose, rougeou jaune révèle la présence des flavonoïdes .

II-2-1 -1- -Les saponines

Un décocté de 2 % est préparé avec 5g de poudre de *Thymus vulgaris* dans 50 mL d'eau distillée et maintenir une ébullition pendant 30 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique . Par la suite, le mélange a été filtré le et déplacé dans des tubes à essai avec l'ajout de H₂SO₄ dans ces tubes.

Leur présence est déterminée quantitativement par le test de la mousse, dans des conditions déterminées puis introduit dans un tube à essai est agité vigoureusement, la formation d'une mousse (hauteur supérieur de 1cm) stable ,persistante pendant 15 min, indique la présence de saponines (Yves Alain et al, 2007).

II-2-1 -1-3-Les tanins

5 g de poudre de *Thymus vulgaris* a été mélangé avec 50 mL d'eau distillée bouillante .Après 30 minutes , la filtration a été effectuée par bande à gaz pour l'obtention d'un filtrat.

Concernant les tanins catéchiques, 5 mL de l'infusé ont été évaporés à sec. Après ajout de 15 mL du réactif de Stiasny au résidu, le mélange a été maintenu au bain-marie à 80 °C pendant 30 min. L'observation d'un précipité orange caractérise les tanins catéchiques.

Les tanins galliques, hydrolysables, leur mis en évidence a été réalisée par l'ajout de FeCl₃. En effet, nous avons filtré la solution précédente puis la saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl₃ à 2% provoque l'apparition d'une teinte bleu-noire intense dénotant la présence de tanins galliques. (Harborne, J.B,1998).

II-2-1 -1-4-Les quinones

Dans un Becher , 5g de matériel végétale broyé de *Thymus vulgaris* a été humecté de quelques gouttes de HCL puis 10 mL d'éther de pétrole ont été ajoutées . Après filtration, 2 ml de filtrat sont agités avec 2 ml de NaOH à 10 %. La coloration rouge virant au violet apparait en présence des quinones. **(Harborne, J.B,1998).**

II-2-1 -1-5-Les stéroïdes et les terpènes

5 g de poudre de *Thymus vulgaris* a été macérés dans 20 mL d'éther de pétrole, filtrés et déplacés dans des tubes à essai . 0,5 mL d'acide sulfurique concentré au triturât. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre et violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive. **(Harborne, J.B,1998).**

II-2-1 -1-6-Les alcaloïdes

Une solution de 1 ml acide sulfurique et de 10 mL d'eau distillée a été mélangée avec 200 mg de poudre de *Thymus vulgaris*. Ensuite ,le mélange a été filtré et mis dans 3 tubes à essai.

Dans les trois tubes à essai, placer 2 mL de l'extrait à analyser., ajouter 2 mL de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5 mL de réactif de Wagner dans le second tube. Le troisième tube est considéré comme un témoin . Respectivement, des précipités blancs ou bruns apparaissent, indiquant la présence d'alcaloïdes. **(Harborne, J.B,1998).**

II-2-1-2-Préparation de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris*

Plusieurs solvants organiques peuvent être utilisés pour l'extraction des composés

Matériels et Méthodes

phénoliques, mais le méthanol est le solvant le plus recommandé, car il donne le meilleur rendement d'extraction (Fellah et al., 2008).

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon un protocole suivi par (Djahra, 2014), avec quelques modifications .

*Macération

L'extrait est obtenu par la macération de 60 g de la poudre fine de *Thymus vulgaris* avec 500 mL d'un mélange méthanol / eau distillée (80/20 v/v) dans un bécher enveloppé par le papier aluminium et après ce mélange était agité à sous agitation magnétique pendant une durée de 40 minutes.



Figure 08 :Macération de 60 g de poudre de *Thymus vulgaris* sous agtation (photos personnelles 2023)

*Filtration

Le macérat obtenu a subi par une filtration à l'aide d'un papier Wathman n °1, après cette filtration ,le résidu obtenu est ensuite récupéré dans un volume de 500 mL méthanol/eau distillée et laissée sous agitation pendant 24h.

Après 24h, l'opération précédente de la filtration à l'aide d'un papier Wathman est répétée avec le deuxième macérat.



Figure 09 : La filtraion (photos personnelles ,2023)

***Évaporation**

Après filtration du mélange, l'extrait a été évaporé à sec sous pression réduite à 52°C grâce à un évaporateur rotatif pour obtenir un extrait sec (**Bougandoura et Bendimerad, 2012**) . l'extrait obtenu était mis à l'étuve de 40°C pour sécher complètement pendant 48 h .l'extrait a été pesé et stocké dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'utilisation.

Matériels et Méthodes

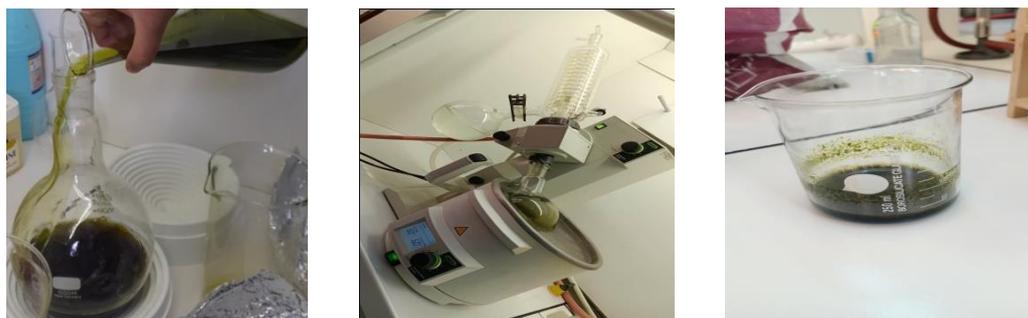


Figure 10 : Évaporation de l'extrait méthanolique du *Thymus vulgaris* (photos personnels, 2023).

Matériels et Méthodes

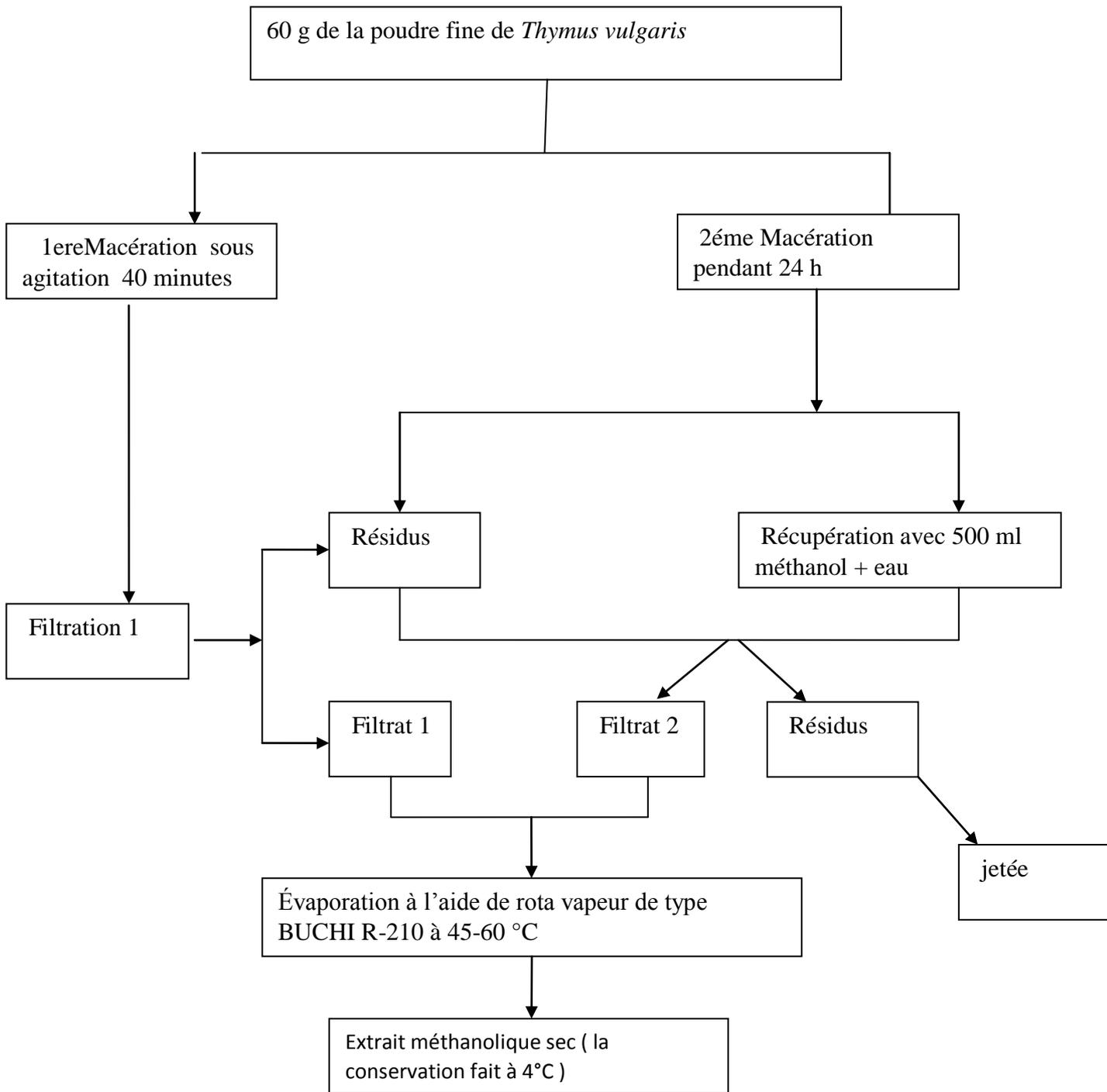


Figure 11 :Diagramme d'extraction méthanolique de *Thymus vulgaris*.

II-2-1-2-1-Détermination de rendement de l'extrait

Selon (**Hadj Moussa.A, 2012**), le rendement en pourcentage de de l'extrait sec a été calculé par la formule :

$$R (\%) = M 1 / M 0 100 \times$$

R(%) : rendement en pourcentage.

M 1 : masse en gramme de l'extrait sec résultant.

M0 : masse en gramme du matériel végétal de départ.

*Les souches bactériennes testées :

Les souches bactériennes testées pour étudier l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* sont prélevées d'infection urinaire.

Matériels et Méthodes

Tableau 04: Tableau descriptif des différentes souches bactériennes testées.

Les souches bactériennes	La famille	La forme	Gram	L'origine de prélèvement	Lieu de récupération
<i>E.coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	bacille	Négatif	Infection urinaire	Laboratoire d'analyses médicales Hannibal -Tébessa-
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Yersiniaceae</i>	bacille	Négatif	Infection urinaire	Laboratoire d'analyses médicales Hannibal -Tébessa-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	bacille	Négatif	Infection urinaire	Laboratoire d'analyse médicale privé Elit L'abm –Tébessa-
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	coque	Positif	Infection urinaire	Laboratoire d'analyse médicale privé Elit L'abm –Tébessa-
<i>Staphylococcus épidermidis</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	coque	Positif	Infection urinaire	Laboratoire d'analyse médicale privé Elit L'abm –Tébessa-

II-2- 2. Les milieux de culture utilisés

II-2- 2- 1- Méthode

Tableau 0 5 : Tableau descriptif des milieux de culture utilisés

Milieux de culture	Utilisation
Gélose nutritive (GN)	Repiquage des colonies
Bouillon Nutritif (BN)	Revivification et enrichissement des souches bactériennes testées
Gélose de Muller Hinton (MH)	Étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens
Gélose Chapman	Culture des <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Staphylococcus épidermidis</i>
Gélose Mac conkey	Milieu sélectif pour les bactéries bacilles à gram négatif

II-2- 2- 1-1- Revivification microbiologique des souches microbiennes

Afin de pouvoir utiliser les souches bactériennes testées, elles ont été revivifiées dans le milieu de culture bouillon MH pour cela un repiquage dans des tubes contenant du bouillon MH a été effectué à partir des milieux de conservation des souches, ces tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h.

II-2- 2-1-2- Vérification de la pureté des souches bactériennes

. II-2- 2-1-2-1- Repiquage sur les milieux sélectifs

Les souches bactériennes testées ont été repiquées à partir des cultures contenues dans le bouillon nutritif sur les milieux sélectifs, suivies d'une incubation à 37°C pendant 24h. (Annex7).

II-2-2-1-3--Évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* par méthode d'Aromatogramme

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Aromatogramme) (Lesueur et al,2007). Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme .la présence de

Matériels et Méthodes

l'activité antibactérienne se manifeste par l'apparition d'une zone circulaire transparente autour du disque qui correspond à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible.

II-2-2-1-3- 1- Préparation de la solution mère

La préparation est comme le protocole :

Dans un bécher stérile, on dissolvait 1g de l'extrait méthanolique brut avec 1 ml de DMSO (Diméthylsulfoxyde). La solution qui a été préalablement préparée était déplacée dans un tube stérile pour l'homogénéisation à l'aide d'un vortex.



Figure 12 :Préparation de la solution mère de l'extrait méthanolique

(Photos personnelles,2023)

II-2-2-1-3-2-Préparation des disques

Nous avons utilisé le papier Whatman n°1 de 6 mm coupé en contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques une fois préparés, sont introduits dans un flacon en verre et ont placé dans l'autoclave pendant 20 minutes à 120 °C pour éviter tous risques de contamination au germe exogène au cours de l'expérimentation.



Figure 13 :Préparation des disques(Photo personnelle,2023)

II-2-2-1-3-3- Préparation de l'inoculum

L'activité antibactérienne doit être réalisée sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle. Pour leur réactivation, les souches sont repiquées par la méthode des stries sur gélose nutritive pré-coulée dans des boîtes de pétri puis incubées à 37°C pendant 18 à 24h.

Pour préparer l'inoculum, des colonies similaires bien isolées sont prélevées à l'aide d'une anse de platine puis déchargées dans 10 ml eau physiologie stérile. La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée à l'aide d'un vortex et sa turbidité est ajustée à 0.5 McFarland (**Annexe 5**), soit une densité optique égale à 0.08 à 0.10 à une longueur d'onde de 625 nm correspondant à 10^8 UFC /ml. (**Fenghour et al,2021**).

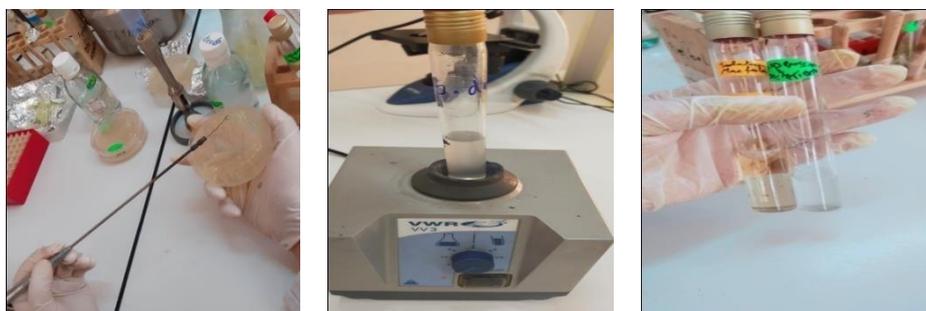


Figure 14: Préparation de l'inoculum (Photos personnelles, 2023)

II-2-2-1-3-4- Préparation des dilutions

Les dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) ont été préparées à partir de la solution mère préparée préalablement dans cinq tubes eppendorfs stériles marqués de 1/2 jusqu'à 1/32. À l'aide d'une micropipette nous avons déposés dans les cinq eppendorfs marqués un volume de la SM dilués dans un volume de DMSO.

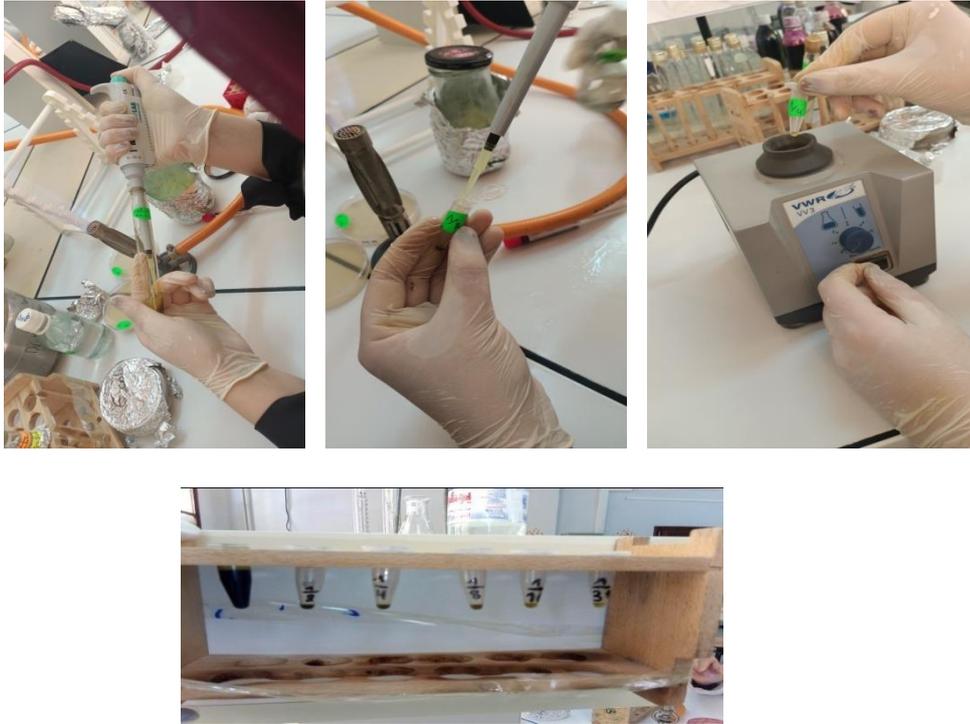


Figure 15:Étapes de préparation des dilution (photos personnelles 2023)

II-2-2-1-3-5- Ensemencement et dépôts des disques

Dans des boîtes de pétri ,le milieu de culture gélosé Mueller Hinton en surfusion a été coulé aseptiquement à raison de 15 mL par boîte .



Figure 16 : Ecoulement du milieu de culture MH (photos personnelles,2023).

Après la solidification ,un écouvillon stérile été imbibé dans la suspension bactérienne (*S.aureus*, *K.pneumoniae* , *Serratia marcescens* *E. coli* , *S.aureus* ,*S.epidermidis* ,) et étalé à la surface de la gélose à quatre reprises sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution égale de

Matériels et Méthodes

l'inoculum. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

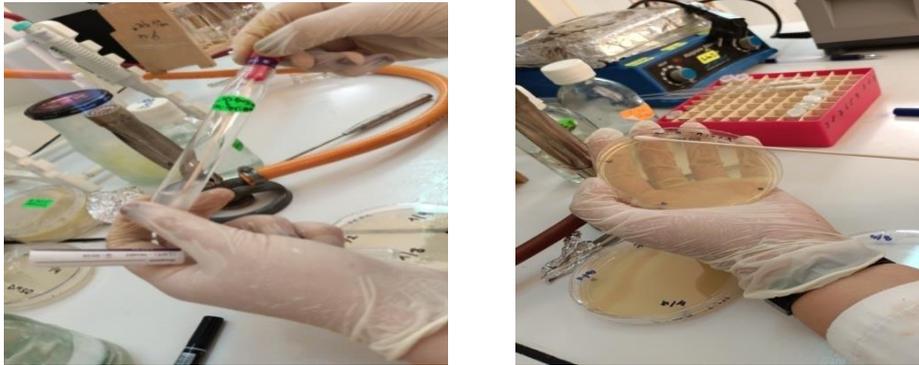


Figure 17 : Ensemencement des bactéries sur MH (photos personnelles,2023).

À l'aide d'une pince stérile, sept disques ont été déposés à la surface de la gélose en laissant des espaces adéquats entre eux pour éviter le chevauchement des zones d'inhibitions.



Figure 18 : Dépôts des disques sur la surface de la gélose (photos personnelles,2023).

À l'aide d'une micropipette, cinq disques sont imbibés de 10 μ l de chaque dilutions.

Le sixième disque est imbibé de 10 μ l de l'extrait méthanolique pure, et pour le septième est imbibé de 10 μ L de DMSO, représente le témoin négatif. L'expérience est répétée deux fois successives pour chaque souche bactérienne testée.

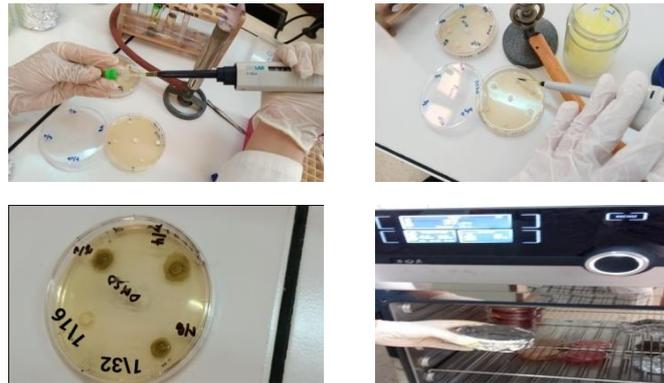


Figure 19 : Imprégnation des disques et incubation dans l'étuve à 37°C pendant 24h (photos personnelles) .

Les boîtes sont ensuite fermées et laissées diffuser à la température ambiante pendant 30 minutes et mise à l'étuve à une température de 37 °C pendant 24 heures.

À la fin de l'incubation, nous avons noté l'activité des extraits, en mesurant la zone d'inhibition claire, autour des disques, à l'aide d'un pied à coulisse.

II-2-2-1-3--Évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* par méthode des microdilution

II-2-2-1-3-1- Détermination de la concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La méthode des microdilutions en milieu liquide permet de déterminer les paramètres (CMI , CMB) .

De façon générale la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 h. La technique de microdilution dans des microplaques à 96 puits est la méthode choisie pour déterminer la CMI des extraits testés (**Fadipe et al., 2015**). Par contre la CMB (concentration minimale bactéricide) qui correspond à la plus faible concentration de l'extrait méthanolique capable de tuer plus de 99.9 % de l'inoculum bactérien initial.

L'étude est réalisée en microplaques en matière plastique comportant 96 puits à fond « U » (8 rangées de 12 puits numérotés de 1 à 12), les 8 rangés sont marqués de (**A ,B ,C ,D , E , F,G ,H**) par méthode de (**Dieye, P. I.,et al 2021**)

Matériels et Méthodes

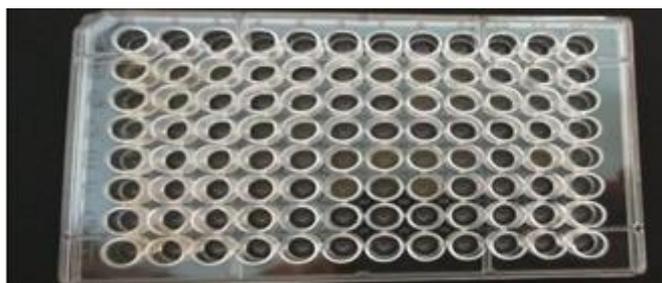


Figure 20 : Microplaque pour la détermination de la CMI et CMB (photo personnelle , 2023). .

D'abord , l'inoculum de chaque souche bactérienne testés à l'aide d'une anse de platine stérile .Pour chaque isolats testés , une colonie bactérienne bien isolée a été prélevée à partir d'une culture jeune de 24h et ensemercer dans un tube de 10 ml de l'eau physiologie stérile et agiter par un vortex .



Figure 21 : Suspensions bactériennes préparés (photo personnelle,2023)

Ensuite, la solution mère a été préparée à partir d'un mélange de 1g de l'extrait méthanolique brut et 10 mL DMSO.



Figure 22 : Solution mère de l'extrait méthanolique (photo personnelle, 2023)

Matériels et Méthodes

Puis, Les rangés (A / B / C / D / E) de la microplaque ont été marquées pour les souches bactériennes testés . (rangé A pour *Klebsiella pneumoniae* / rangé B pour *Serratia marcescens* / rangé C pour *E.coli* / rangé D pour *Staphylococcus épidermidis* / rangé E pour *Staphylococcus aureus*) .

A l'aide d'une micropipette , nous avons déposés 100 μ l de milieu MH liquide dans les puits.



Figure 23 : Dépôts de 100 μ l bouillon MH dans les puits de la microplaque
(photo personnelle ,2023).

Ensuite , nous avons déposés 100 μ l de l'extrait méthanolique préparé préalablement dans le premier puits de chaque rangé .

Une série de dilutions a été réalisée extemporanément à partir du puits 1 ,par le transfert de 100 μ l de puits en puits jusqu'au puits 12 (le 100 μ L du dernier puits a été jeté).il faut bien mélanger le contenu de chaque puit .



Figure 24 : Ajout de 100 μ l de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgar* (photo personnelle , 2023).

Matériels et Méthodes

Enfin, 10 µl de la suspension bactérienne a été ajoutée dans les 12 puits



Figure 25 : Ajout de 10 µl de l'inoculum bactérien (photos personnelles, 2023).

Les 10 puits de rangé **F** correspondent à 10 µl de la suspension bactérienne mélangée avec 100 µL du bouillon MH. En effet, chaque deux puits correspondent à une seule souche bactérienne. (*Klebsiella pneumoniae* (**F3, F4**) / *Serratia marcescens* (**F5, F6**) / *E. coli* (**F7, F8**) / *Staphylococcus epidermidis* (**F9, F10**) / *Staphylococcus aureus* (**F11, F12**)).

Le témoin négatif marqué à rangé **G**, correspond à un mélange de 100 µl bouillon MH avec 100 µl extrait méthanolique de *Thymus vulgaris*.

À la fin, la microplaque couverte incubée à 37°C pendant 24h. la lecture se fait visuellement, la CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germe.



Figure 26 : Incubation de la microplaque à l'étuve à 37°C pendant 24h (photo personnelle, 2023).

II-2-2-1-3- 2- Détermination de la concentrations minimales bactéricides (CMB)

La CMB évaluée en milieu solide a été réalisée par transfert du prélèvement de chaque puit ne présentant pas de croissance dans des boîtes de pétri contenant la gélose Muller Hinton.

Résultats et Discussion

Résultats

III-1-Détermination de rendement de l'extrait méthanolique de *thymus vulgaris*

Le rendement de l'extrait brut de *Thymus vulgaris* par l'extraction, a été déterminé par rapport à la poudre sèche initiale.

Tableau 06 : Résultats de rendement de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* .

Masse en poudre	Masse de l'extrait brut	Rendement (%)
60 g	11.15 g	18.58 %

L'extraction a été effectuée par le solvant de Méthanol, ce qui a permis l'obtention d'un extrait méthanolique sec (ExMet).

Le rendement est exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la plante sèche.

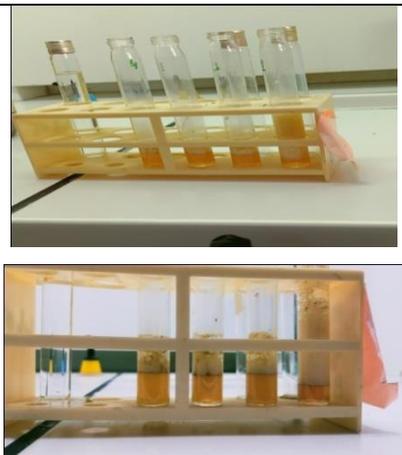
Le rendement de notre plante est supérieur à celui trouvé par **(Benlantreche,2021)** de M'sila qui est égale à (5%) et également supérieur à celui à indiquer dans le résultat de Batna **(Yakhlef,2010)** qui a trouvé (6.24%) qui est de rendement de 6.24%.

Résultats

III-2-Screening phytochimique de thymus vulgaris

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur la poudre de *Thymus vulgaris* sont mentionnés dans le tableau ci-dessous .

Tableau 07: Résultats de screening phytochimique de *Thymus vulgaris*.

Métabolite recherché	Résultat obtenue	Présence (+) Absence (-)	Interprétation
Flavinoïdes		(+)	Isoflavone (parmi la famille des flavinoïdes) L'apparition de la couleur jaune claire indique la présence de l'isoflavone.
Taninns catéchique		(+)	Apparition de couleur vert foncée
Taninns gallique		(+)	Apparition d'une teinte (précipita) bleu-noire .
Terpènes		(-)	Absence de couleur rouge.

Résultats

Stéroïdes		(+)	Apparition de couleur vert.
Saponine		(-)	Absence de la mousse persistante.
Quinones		(+)	Apparition de la couleur rouge au violet.
Alcaloïdes		(-)	Absence de précipita.

Les résultats mentionnés dans le tableau 7 du test phytochimique réalisée sur la poudre de *Thymus vulgaris* montrent la présence des isoflavonoïdes et tannins cathéchique et gallique, stéroïdes, quinones et l'absence des terpènes, saponine et l'absence des alcaloïdes.

Résultats

a) Les isoflavonoïdes

Notre étude montre le virage de la couleur en jaune ce qui signifie la présence des isoflavonoïdes . nos résultats montrent une similarité avec les résultats de Boumerdes (Abbas,2016) et Tiaret (khitour ,2022) qui indique une présence des flavones.

Ces composés jouent des rôles très importants dans les plantes, dont elles protègent les plantes contre le stress hydrique. Les flavonoïdes reconnus par de nombreuses activités biologiques, ils protègent les aliments d'origine végétale de l'oxydation, ce sont des antioxydants réputés pour leur action anti radriculaire (Makhloufi, 2013).

b) Les tannins

Pour le test des tanins, le virage de la couleur au vert foncé, ce qui signifie la forte existence des tanins condensés (catéchiqes), alors que l'apparition d'une précipitat bleu noire est signifie la présence des tannins gallique. Nos résultats sont concordants avec le résultat de Boumerdes (Abbas,2016) .

Selon (Iserin ,2001), les tanins permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections.

c) Les terpènes

Nos résultats montre que l'absence des terpènes . Alors que (Abdelli,2017) de Mostaganem et de Tiaret (Khitour,2020) ont trouvé que le *Thymus vulgaris* contient des terpènes.

d) Les stéroïdes

Nos résultats montrent l'apparition de couleur vert-foncé ,ce qui indiquent la présence des stéroïdes dans les feuilles de *Thymus vulgaris* . Nos résultats sont en accord avec les travaux de Mostaganem (Abdelli,2017) et Tiaret (Khitour,2020) .

e) Saponines

Le test de saponines est confirmé par l'apparition de mousse plus de 1cm de hauteur, Les résultats montrent l'absence de ces composés dans le la plante étudiée. .

Résultats

Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Abdelli,2017) de Mostaganem , contrairement aux travaux de (Khitour,2020) de Tiaret et (Abbas,2016) de Boumerdes.

f)Les Quinones

Le tableau 2 illustre également le contenu de l'extrait en quinones libres. Ces derniers sont confirmés par le virage de la couleur rouge au violet dans le milieu réactionnel. Les résultats enregistrent la présence de ces composés dans la plante. Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Abbas,2016) et (Abdelli,2017) .

Les quinones ont un effet irritant et laxatif sur le gros intestin, en provoquant des contractions des parois intestinales, simulant les évacuations et facilitant ainsi le transit intestinal, cela explique l'effet stomachique du romarin (Makhloufi, 2013).

g)Les alcaloïdes

Les alcaloïdes dont leur présence est confirmée par l'apparition d'un précipité blanc jaune en quantité importante dans l'extrait aqueux, Ceci indique que *Thymus vulgaris* est pauvre en alcaloïdes. Ces résultats montrent ne concordent pas avec les résultats de (Abdelli,2017) et (Khitour,2020) qui a jugé la présence de ces métabolites dans la plante étudiée.

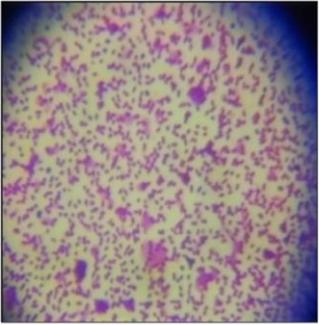
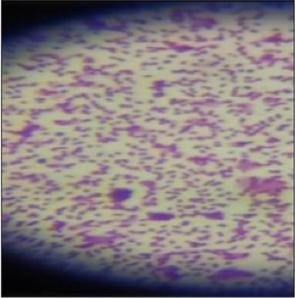
Selon (Guessan et al, 2009) , les alcaloïdes présentent des activités anti-spasmodique, anti-rhumatismal, analgésique et anticancéreuse. Leur effet laxatif est aussi révélé.

Résultats

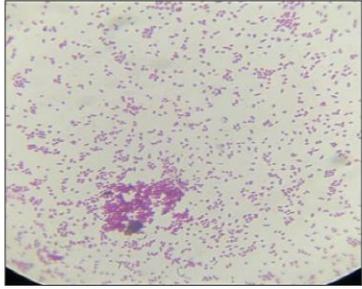
III-3-Confirmation de la pureté des souches bactériennes étudiées

Les résultats de la vérification de la pureté des souches bactériennes sont présentés dans le tableau .

Tableau 8: Aspect microscopique et macroscopique sur milieux sélectif des souches bactériennes testés (photos personnelles,2023).

Les souches bactériennes	Aspect macroscopiques sur milieu sélectif	Aspect microscopique après coloration de Gram
<i>E.coli</i> Gram -		
<i>Serratia marcescens</i> Gram -		

Résultats

<p><i>Klebsiella pneumoniae</i> Gram -</p>		
<p><i>Staphylococcus aureus</i> Gram +</p>		
<p><i>Staphylococcus épidermidis</i> Gram +</p>		

Résultats

III-4- Évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* par la méthode d'Aromatogramme

Nous avons étudiés in vitro le pouvoir antibactérien d' l'extrait méthanolique du *Thymus vulgaris* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton) .

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait à tester vis-à-vis de cinq germes pathogènes responsable des infections urinaires (*E.coli*, *Serratia marsescens* ,*K.pneumoniae*, *S. aureus*,*S.épidermidis*) après 24heurs d'incubation à une température adéquate de 37°C. Le pouvoir antibactérienne de cet extrait méthanolique est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en (mm) a l'aide d'un pied à coulisse (Annexe09).

L'échelle d'estimation de l'activité antibactérienne est donnée par (Mouas et al,2017).

Ils ont classés les diamètres (D) des zones d'inhibition de la croissance bactérienne en 4 classes.

Tableau 09 :Sensibilité des souches bactériennes en fonction des zones d'inhibition (Mouas et al,2017).

Sensibilité	Zone d'inhibition
Résistante	D <8 mm
Sensible	9 mm < D < 14 mm
Très sensible	15 mm < D < 19 mm
Extrêmement sensible	D > 20 mm

Les résultats issus de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* par la méthode de diffusion sur milieu solide sont indiqués dans le tableau :

Résultats

Concernant l'extrait méthanolique pure de *Thymus vulgaris*, des zones d'inhibition sont observées chez toutes les souches bactériennes testées qui indiquent que l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* a une activité importante antibactérienne.

D'abord, Pour les bactéries à Gram positif *S.aureus* et *S.épidermidis* qui ont marquées des zones d'inhibitions supérieurs à 20mm. Et pour les Gram négatifs, l'extrait a montré un effet remarquable sur les bactéries *E.coli*, *S.marsescens*, *K.pneumoniae* avec un diamètre d'inhibition varie entre 15 et 19. (Annexe8).

De ce fait, les bactéries à Gram + sont extrêmement sensibles à l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* par rapport aux bactéries à Gram - qui sont très sensi. Donc, les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* possède un large spectre d'activité antibactérienne sur les bactéries Gram positifs que Gram négatifs.

Des résultats similaires ont été rapportés par (**Khitour, 2020**) qui a montrés montre que l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* de la région de Takhemaret wilaya de Tiaret a une très forte activité à *E.coli* et *K.pneumoniae* et *S.aureus*.

L'extrait de méthanol de *Thymus vulgaris* présentent des effets antibactériens plus ou moins élevés sur toutes les bactéries. Selon **Rhayour et al., 2003**. Ont expliqué la sensibilité des bactéries testées par la lyse cellulaire suite à une action de l'extrait méthanolique sur la paroi et la membrane des bactéries en provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires. De même, l'acidification de l'intérieur de la cellule sous l'action des extraits bloquent la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure. **Bouhdid et al., 2012; Cvetanović et al., 2015**. Ont justifié la sensibilité des bactéries par la destruction du matériel génétique, provoque la mort de la bactérie, d'autre part les flavonoïdes possèdent de mécanisme de toxicité par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires des micro- organisme (**Basli et al., 2012**).

D'après **Dorman et al., 2000** et **Djahra et al., 2013** les composants phénoliques sont très actifs contre les micro-organismes et agissent comme des agents dénaturants les protéines.

Résultats

Les résultats obtenus avec les différentes dilutions montrent que l'ExMet un effet importante sur *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus épidermidis* par rapport aux *E.coli* et *Serratia marsescens* et *Klebsiella pneumoniae* .

À la dilution 0.625 mg./ml l'extrait méthanolique n'a aucun activité sur toutes les souches bactériennes testées aussi bien à Gram + et à Gram - .

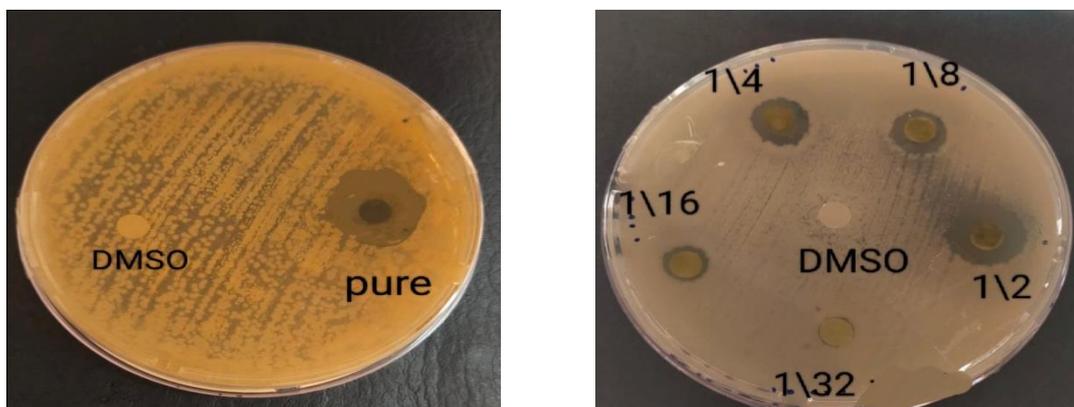


Figure 27 : Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* sur *E.coli* (photos personnelle,2023). .

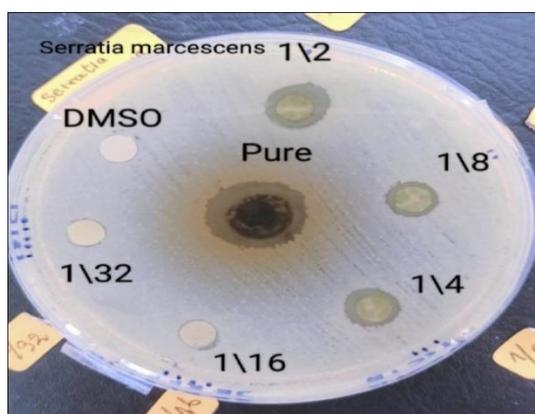


Figure 28:Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* et dilué sur *Serratia marsescens* (photos personnelle,2023). .

Résultats

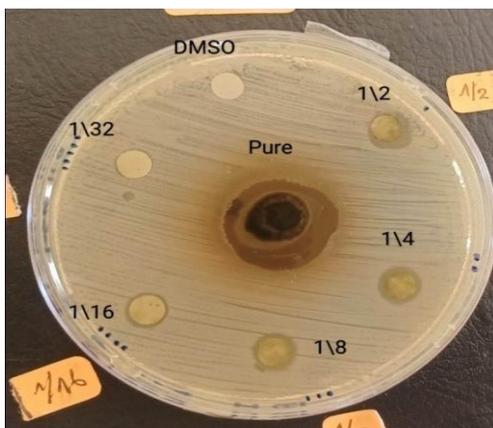


Figure 29 : Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* sur *Klebsiella pneumoniae* (photos personnelle,2023).

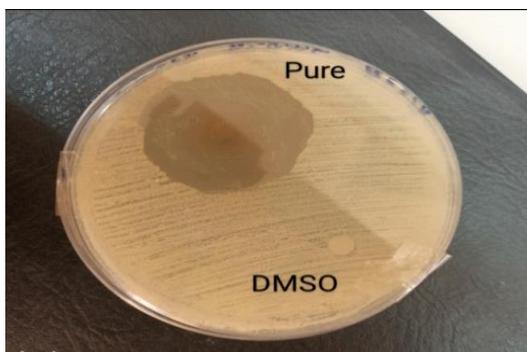


Figure 30 : Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* sur *Staphylococcus aureus* (photos personnelle,2023).

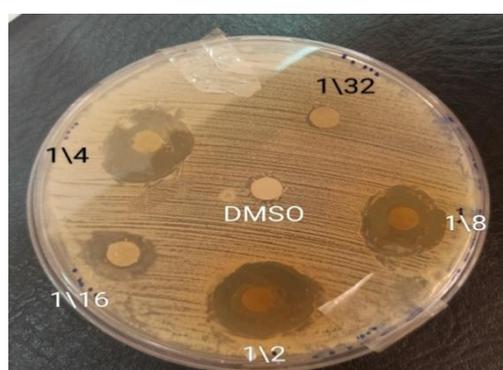
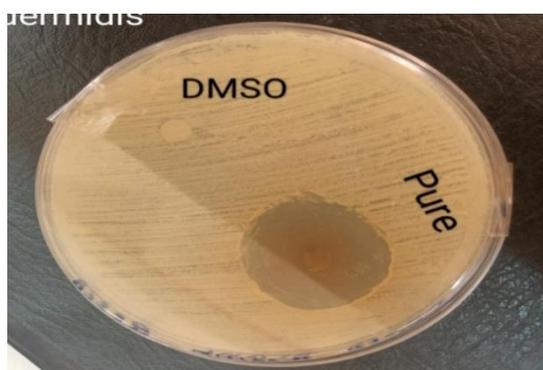


Figure 31 : Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* sur *Staphylococcus epidermidis* (photos personnelle,2023).

Résultats

III-5-Évaluation de l'activité antibactérien de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* par méthode de microdilution

III-5-1-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Après 24 heures d'incubation des microplaques nous avons remarqué l'apparition d'un aspect clair dans certains puits, dans d'autres un dépôt (dans certain cas on observe un trouble) indiquant une croissance bactérienne. (Tableau n° 10)

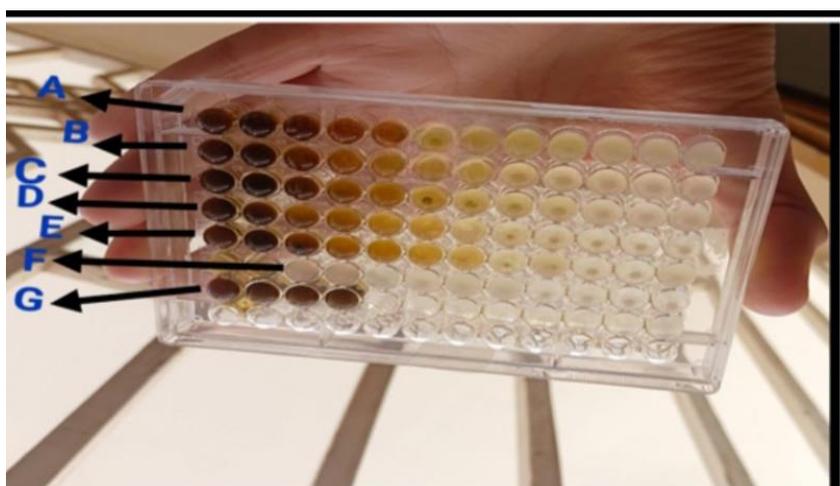


Figure 32: Détermination CMI pour les souches bactériennes testées Gram + et Gram – (Photo personnelle,2023) .

A : *Klebsiella pneumoniae*.

B : *Serratia marsescens* .

C : *Escherichia coli*.

D : *Staphylococcus aureus*.

E : *Staphylococcus épidermidis*.

F:Contrôle positif. (Bouillon MH+souche bactérienne).

G:Contrôle négatif.(Bouillon MH+ExMet).

Les résultats des microplaques obtenus dans notre étude sont résumés dans le tableau 10.

Résultats

Tableau 10 : Effet des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* sur la croissance des bactéries Gram + et Gram-..

Puits Souche bactériennes	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.79	0.39	0.19	0.09	0.04	0.02
	mg/ml											
K .pneumoniae	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S.marsescens	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E.coli	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S.aureus	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
S.épidermidis	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

- : Absence de trouble + : Présence de trouble

E.coli : *Escherichia coli* , *S.marsescens* : *Serratia marsescens*, *K.pneumoniae* : *Klebsiella pneumoniae*, *S.aureus* : *Staphylococcus aureus*, *S.épidermidis* : *Staphylococcus épidermidis* .

un aspect clair indiquent une inhibition totale de la croissance bactérienne

Résultats

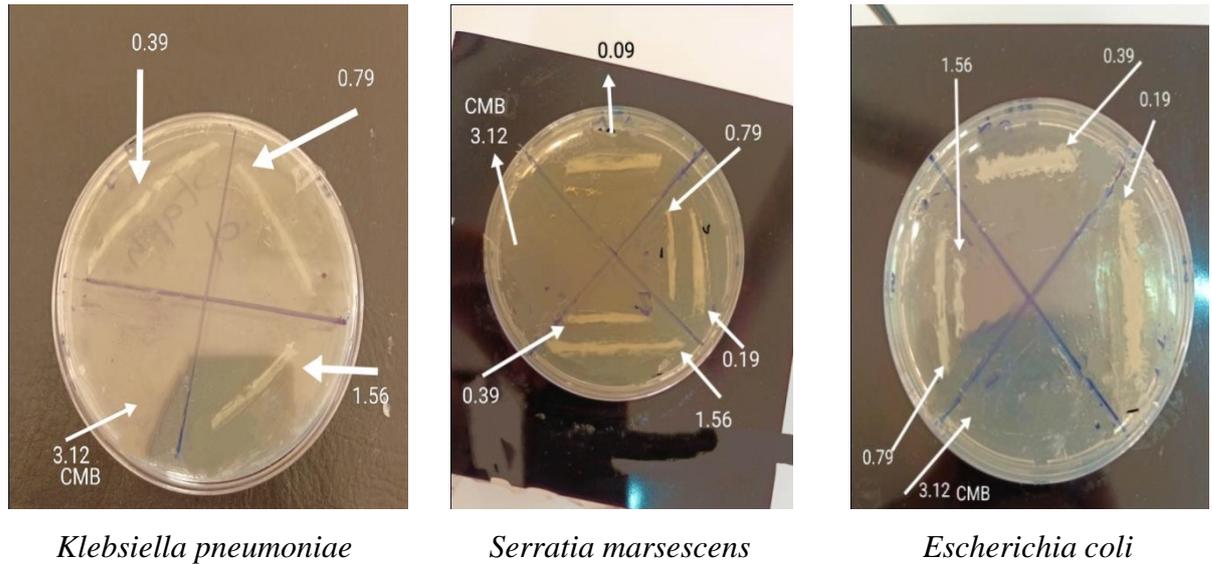


Figure 33 : Concentrations minimales bactéricides de l'extraits méthanolique de *Thymus vulgaris* chez les bactéries Gram négatifs (photos personnelles,2023)

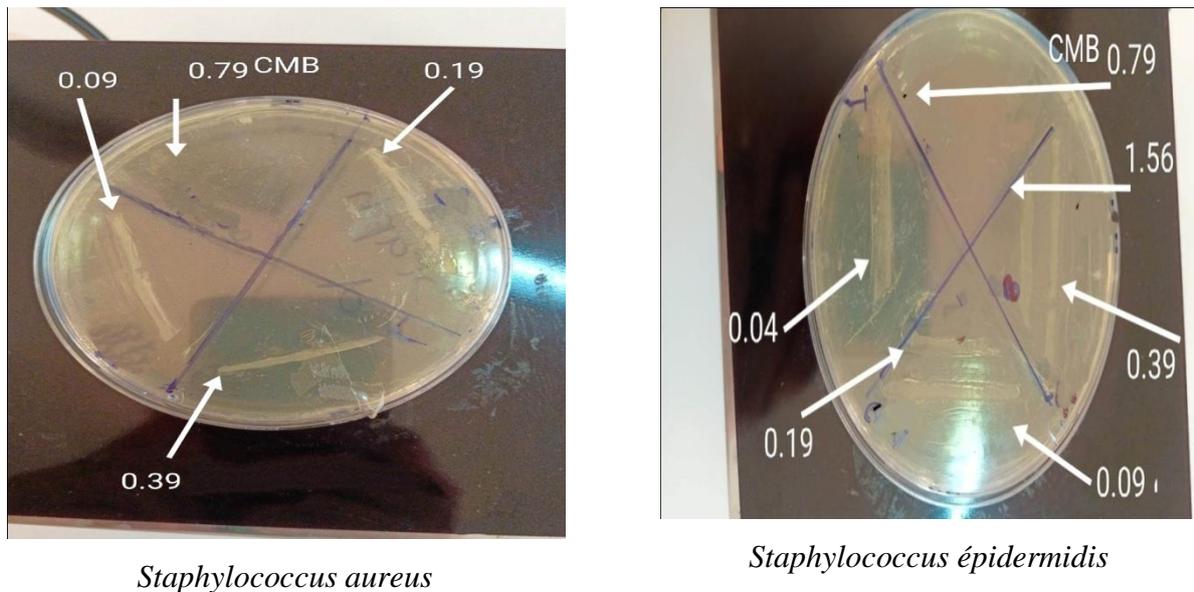


Figure 34: Concentrations minimales bactéricides de l'extraits méthanolique de *Thymus vulgaris* chez les bactéries Gram positifs (photos personnelles,2023)

Résultats

III-5-2-Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Sur la base de ces résultats ,nous pouvons définir le caractère de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* à partir de ce rapport CMB/CMI

Selon **Kamanzi (2002)**, l'extrait est bactéricide quand sa CMB est égale à sa CMI ou si le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 4. Il est dit bactériostatique quand sa CMB est supérieure à sa CMI ou si le rapport CMB/CMI est plus élevé que 4

Tableau 11: Valeurs des CMI et CMB et rapport caractéristique de l'extrait methalonique de *Thymus vulgaris*.

Les souches bactériennes	CMI mg/mL	CMB mg/mL	CMI / CMB
<i>K.pneumoniae</i>	3.12	3.12	1
<i>E.coli</i>	3.12	3.12	1
<i>Serratia.marsescens</i>	3.12	3.12	1
<i>S.aureus</i>	0.79	0.79	1
<i>S.épidermidis</i>	0.79	0.79	1

En général , les valeurs de la CMI de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* sont égales 3.12 mg/ml pour les bactéries à gram négatifs et de 0.79 mg/ml pour les bactéries à gram positifs .Le rapport CMB/CMI est à pour les cinq souches bactériennes testées est égale à 1 ,donc, cet extrait méthanolique semble pour exercer une activité bactéricide contre toutes les souches bactériennes testées.

Conclusion

Conclusion

Dans la présente étude, l'objectif principal était l'étude des propriétés physicochimiques et l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique extraite de la partie aérienne d'une espèce de la famille de Lamiaceae, le *Thymus vulgaris* qui très connu dans la médecine traditionnelle .

L'extraction de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* a été réalisée par évaporation .Le rendement a été 18.58 % .Cette valeur est supérieur aux rendements obtenus chez d'autres études de la même espèce.

Le screening phytochimique a montré la présence des molécules bioactives à savoir les isoflavonoïdes, les tannins galliques et catéchiques ,les stéroïdes et les quinones . Ces biomolécules jouent un rôle essentiel pour la survie de la plante..

L'évaluation de l'activité antibactérienne l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* a montré que les souches bactériennes à Gram- testées (*Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*, *Serratia marsescens*) sont très sensibles alors que les bactéries à Gram+ (*Staphylococcus aureus* , *Staphylococcus épidermidis*) sont extrêmement sensibles à l'activité de cet extrait.

En effet, les concentrations minimales inhibitrice étaient égales avec les concentrations minimales bactéricides , ont montrée des valeurs variable de 3.12 mg/ml pour les bactéries à Gram – et 0.79 mg/ml avec les bactéries à Gram + , témoignant ainsi une forte activité bactéricide de l'extrait méthanolique . Les rapports CMI /CMB sont égaux à 1 pour toutes les souches bactériennes testées. l'extrait Met de *Thymus vulgaris* est considérée donc, comme bactéricide.

En perspective, il serait intéressant d'élargir le champs d'application de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* sur d'autres souches bactériennes et fongiques provenant d'autres types d'infections. Également ,il est important de faire une étude qualitative et quantitative de l'extrait méthanolique par des méthodes plus précises notamment la CPG ou l'HPLC pour déterminer le métabolite secondaire actif dans la plante étudiée.

Référence bibliographique

- A -

- Abbas, N., Guerriche, F. (2016)** Etude phytochimique du thym *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) et évaluation insecticide de son extrait éthanolique brut vis-à-vis de deux insectes, nuisible *Aphis fabae* et utile *Apis mellifera* (université boumerdes)
- Abdelli, W. (2017).** *Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de Juniperus phoenicea et de Thymus vulgaris* (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).
- Abdelli, W., Bahri, F., Romane, A., Höferl, M., Wanner, J., Schmidt, E., & Jirovetz, L. (2017).** Chemical composition and anti-inflammatory activity of Algerian *Thymus vulgaris* essential oil. *Natural product communications*, 12(4), 1934578X1701200435.
- Ahmad, M., Khan, M. P. Z., Mukhtar, A., Zafar, M., Sultana, S., & Jahan, S. (2016).** Ethnopharmacological survey on medicinal plants used in herbal drinks among the traditional communities of Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 184, 154-186.
- Alarcón, R., Pardo-de-Santayana, M., Priestley, C., Morales, R., & Heinrich, M. (2015).** Medicinal and local food plants in the south of Alava (Basque Country, Spain). *Journal of ethnopharmacology*, 176, 207-224.
- Anantharaju, P. G., Gowda, P. C., Vimalambike, M. G., & Madhunapantula, S. V. (2016).** An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition journal*, 15(1), 1-16.
- AREF, M., & HEDED, M. (2015).** Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf).
- Auger, C., & Schini-Kerth, V. B. (2014).** Potentiel des polyphénols à améliorer la protection vasculaire en stimulant la fonction endothéliale. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 49(4), 160-172.

-B-

- Bano, S.; Ahmed, F.; Khan, F.; Chaudhary, S.C.; Samim, M.** Enhancement of the Cancer Inhibitory Effect of the Bioactive Food Component Resveratrol by NanoparticleBased Delivery. *Food Funct.* 2020, 11, 3213–3226.
- Basli, A., Chibane, M., Madani, K., & Oukil, N. (2012).** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10(1), 2-9.
- Belgaid, A et Rahmani, A. (2018).** Activité insecticide du thym (*Thymus vulgaris* L) sur un insecte des stocks *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera Bruchidae). Mémoire de Master, Université de Bouira, Algérie.

- Belmalha, S., M. El Idrissi, et al. (2015).** Caractérisation chimique de certaines especes de thym marocain du moyen atlas (region de midelt) chemical characterization of some species of moroccan middle atlas thyme (region of midelt). *Global Journal of Pure and Applied Chemistry Research* 3(2): 43-52.
- Benmadi, Z et Abida, H. (2018).** Effet des extraits de *Thymus vulgaris* chez Escherichia.
- Benlatreche, B., Kaci, A. A., & Baya, A. (2021).** *Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de Thymus vulgaris* (Doctoral dissertation, UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA).
- Benteyeb A., Djemmal S., (2014).** Contribution à la mise en évidence in vitro de l'efficacité des huiles essentielles de *thymus ciliatus* et *thymus dreatensis* contre les champignons lignivores, thèse de master en microbiologie, université Constantine 1, p 4-10.
- Bertille B., 2011.** Les Rubiacées : botanique, biochimie et plantes utiles. Université de Lille II:Lille, p:71-73.
- Binate, G., & Dikes, L. (2018).** Etude de l'effet antibactérien et prébiotique des extraits de *Thymus vulgaris* et de *Thymus serpyllum*. Mémoire de Master, Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, Algérie 17-Boualem S, Boumrar Silia. *Formulation d'un gel désinfectant à base de l'huile essentielle de Romarin (Rosmarinus officinalis L) et évaluation de son activité antimicrobienne.* [Mémoire] Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou, 201.
- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014).** *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of medicine and life*, 7(Spec Iss 3), 56.
- Boubekri, C. (2014).** *Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de Solanum melongena par des techniques électrochimiques* (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).
- Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012).** Effet antifongiques des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp (Nepeta) briq*. *Revue des Bio Ressources*, 2(1), 1-7.
- Bouhdid, S., Abrini, J., Baudoux, D., Manresa, A., & Zhiri, A. (2012).** Essential oils of oregano compact and cinnamon: antibacterial potency and mechanism of action. *Journal de Pharmacie Clinique*, 31(3), 141-148.
- Boudjerda Z. (2013).** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires de *Achillea ligustica* (Anthemideae) , et *Ranunculus cortusifolius* (Ranunculaceae) .Diplôme de Doctorat d'Etat En Chimie Organique Option: Phytochimie .Université MentouriConstantine. 40_41.

Référence bibliographique

Boudjourf, M., Mihoub, Z. M., & Sétif, U. F. A. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. *Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister, Université Ferhat Abbes-Setif.*

Boukhatem M., Ferhat M., Kameli A., Saidi F., Taibi H., Djamel T. (2014). Valorisation de l'essence aromatique du *Thym* (*Thymus vulgaris* L.) en aromathérapie anti-infectieuse. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 8:1418-1431.

Boulade, C. (2018). *Lamiaceae: caractéristiques et intérêts thérapeutiques à l'officine* (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

Bouzabata, A. (2020). Médecine traditionnelle et COVID-19: croyances et réalités 01/04/20 publié dans 20 ans Sci Dev Net, Edition : Afrique Sub - Saharienne.

Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales* (No. 581.634 B7).

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} Edition, lavoisier. Paris. 1234p.

-C-

Carrió, E., & Vallès, J. (2012). Ethnobotany of medicinal plants used in eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 1021-1040.

coli responsable des infections uro-génitales. Mémoire de Master, Université Abdel Hamid Constantine 1.p :40.

Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Mašković, P., Savić, S., & Nikolić, L. (2015). Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds. *Industrial Crops and Products*, 65, 582-591.

-D-

Dauqan, E. M., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris* L.) herb. *Journal of applied biology and biotechnology*, 5(2), 017-022.

del Hierro, J. N., Herrera, T., Fornari, T., Reglero, G., & Martin, D. (2018). The gastrointestinal behavior of saponins and its significance for their bioavailability and bioactivities. *Journal of Functional Foods*, 40, 484-497.

Boutlelis, D. A. (2014). *Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou Marrubium vulgare L* (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar de Annaba, Département de Biologie).

Djedir, G. (2018). Etude comparative entre deux espèces du *Thym*: *Thymus coloratus* et essentielles de thym (*Thymus vulgaris*) contre *Aspergillus niger*. Mémoire de Master.

Diaconeasa, Z., Ayvaz, H., Rugină, D., Leopold, L., Stănilă, A., Socaciu, C., ... & Jefferson, A. (2017). Melanoma inhibition by anthocyanins is associated with the reduction of oxidative stress biomarkers and changes in mitochondrial membrane potential. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72, 404-410.

Djrourou, M et Habouchi, S. (2018). Etude de l'activité insecticide des extraits méthanoïques et huiles essentielles de *Sinapis arvensis* et *Thymus vulgaris* sur les larves de *Aphis spiraeicola* (Patch). Mémoire de Master, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, Algérie.

Dieye, P. I., Ndiaye, S., Dione, F., Diop, A., Dieng, A., Diop, A., ... & Sarr, S. O. (2021). Étude corrélée de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de *Jatropha chevalieri* et de *Cordylia pinnata*, et de leurs profils chromatographiques. *Journal of Applied Biosciences*, 159(1), 16396-16410.

Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.

-E-

El mansouri Khalid. 2013. Recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes médicinales. Thèse pour l'obtention du doctorat en médecine. Université CADI AYYAD à Marrakech, Maroc, pp 18, 19.

-F-

Fadipe, V. O., Mongalo, N. I., & Opoku, A. R. (2015). In vitro evaluation of the comprehensive antimicrobial and antioxidant properties of *Curtisia dentata* (Burm. F) CA Sm: toxicological effect on the human embryonic kidney (HEK293) and human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell lines. *EXCLI journal*, 14, 971.

Fadipe, V. O., Mongalo, N. I., Opoku, A. R., Dikhoba, P. M., & Makhafola, T. J. (2017). Isolation of anti-mycobacterial compounds from *Curtisia dentata* (Burm. f.) CA Sm (Curtisiaceae). *BMC complementary and alternative medicine*, 17, 1-6.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes rendus biologiques*, 331(5), 372-379.

Fani, M., & Kohanteb, J. (2017). In vitro antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* essential oil against major oral pathogens. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(4), 660-666.

Fenghour, H., Bouabida, H., Dris, D., & Houhamdi, M. (2021). Antibacterial effect of essential oils of two plants *Eucalyptus camaldulensis* and *Artemisia herba alba* on some bacterial strains. *Biosystems Diversity*, 29(2), 73-77.

-G-

Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food chemistry*, 102(3), 898-904.

Gilca, M., Tiplica, G. S., & Salavastru, C. M. (2018). Traditional and ethnobotanical dermatology practices in Romania and other Eastern European countries. *Clinics in dermatology*, 36(3), 338-352.

Ghelichnia, H. (2016). Essential oil composition of three species of *Thymus* growing wild in mazandaran, Iran.

Grigoraş, C. G. (2012). *Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans; Universitatea Vasile Alecsandri din Bacău (România)).

Guessoum D. (2015). Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes

-H-

Haddouchi, F., Lazouni, H. A., Meziane, A., & Benmansour, A. (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique science: Revue internationale des sciences et technologie*, 5(2).

Hadj, M. A. (2012). *Contribution à l'étude in vitro de l'effet des extraits de feuilles de Retama raetam sur l'activité de l' α -amylase* (Doctoral dissertation).

Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical Methods* London Chapman and Halls. 91.

Harrar, A. (2012). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L, mémoire de magistère. Herend And Z arucchi (Caesalpinaceae), *Sciences & Nature* Vol. 4 N°2: 217 – 225. Ibn Badis, Mostaganem, Algérie.

-I-

Ibrahim, I.S., ALI, M., ZAGE, A.U. 2016. Phytochemistry of methanolic and aqueous extracts of *eucalyptus camaldunensis* leaves, seeds and stem back. *International Journal of Advanced Academic Research (Sciences, Technology & Engineering)*. Vol. 2 (12), 75-80.

Iserin, P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales. 2e Ed Larousse.

-K-

Kabran, G. R. M., Mamyrbekova-Bekro, J. A., Pirat, J. L., Bekro, Y. A., Sommerer, N., Verbaere, A., & Meudec, E. (2014). Identification de composés phénoliques extraits de deux plantes de la pharmacopée ivoirienne. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, (038),

Kemassi A., Darem S., Cherif R., Boual Z., Sadine SE., Aggoune MS et al., (2014). Recherche et identification de quelques plantes médicinales à caractère hypoglycémiant de la pharmacopée traditionnelle des communautés de la vallée du M'Zab (Sahara septentrional Est Algérien). *Journal of Advanced Research in Science and Technology*:2352-9989.

57-63.

Kamanzi, A. (2002). Plantes médicinales de Côte d'Ivoire: investigations phytochimiques guidées par des essais biologiques. *Doctorat d'Etat ès-Sciences en biologie végétale. UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan.*

Karabin, M., Hudcova, T., Jelinek, L., & Dostalek, P. (2015). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology advances*, 33(6), 1063-1090.

Kemassi, A., Darem, S., Cherif, R., Boual, Z., Sadine, S. E., Aggoune, M. S., ... & Ould El Hadj, M. D. (2014). Recherche et identification de quelques plantes médicinales à caractère hypoglycémiant de la pharmacopée traditionnelle des communautés de la vallée du M'Zab (Sahara septentrional Est Algérien). *Journal of advanced research in science and technology*, 1(1), 1-5.

Khitour, M. A. (2020). *L'Etude biologique de l'extrait méthanolique de la plante médicinale Thymus vulgaris. et comparer son efficacité à certains antibiotiques* (Doctoral dissertation).

Kissoum, A., & Khalfaoui, K. (2015). Evaluation phytochimique et étude des activités biologiques d'une plante médicinale Algérienne (Foeniculum vulgare). *Université des Freres Mentouri Constantine, Algerie.*

Kruk, J., Szymańska, R., Nowicka, B., & Dłużewska, J. (2016). Function of isoprenoid quinones and chromanols during oxidative stress in plants. *New biotechnology*, 33(5), 636-643.

Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370.

-L-

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

Lamami, A. E. O., Fouad, E. A., OUEDRHIRI, W., CHAHDI, F. O., GUEMMOUH, R., & GRECHE, H. (2013). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles

essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain: *Thymus vulagris* et *Thymus satureioidis*. *Les technologies de laboratoire*, 8(31).

Lesueur, D., Serra, D. D. R., Bighelli, A., Hoi, T. M., Ban, N. K., Thai, T. H., & Casanova, J. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Michelia foveolata* Merryll ex Dandy from Vietnam. *Flavour and fragrance journal*, 22(4), 317-321.

Lu, J. J., Bao, J. L., Wu, G. S., Xu, W. S., Huang, M. Q., Chen, X. P., & Wang, Y. T. (2013). Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(3), 456-463.

Lugasi, A. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica szegediensis*, 47(1-4), 119-125.

-M-

Zairi, M., & Bouchagoura, H. (2019). *Comparaison de l'effet antibactérien et antifongique des huiles essentielles de romarin et thymus* (Doctoral dissertation, Université laarbi tebessi tebessa).

Makhloufi, A. (2010). *Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (Matricaria pubescens (Desf.) et Rosmarinus officinalis L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru* (Doctoral dissertation).

Marrelli, M., Conforti, F., Araniti, F., & Statti, G. A. (2016). Effects of saponins on lipid metabolism: A review of potential health benefits in the treatment of obesity. *Molecules*, 21(10), 1404. métrique. Master, Université Aboubakr Belkaid, Tlemcen, Algérie.

Mouas, Y., Benrebih, F. Z., & Chaouia, C. (2017). ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE ET DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DU ROMARIN ROSMARINUS OFFICINALIS L. *Revue Agrobiologia*, 7(1), 363-370.

Mouhi, L. (2017). *Etude des activités biologiques de l'association des huiles essentielles de plantes de la flore Algérienne. Elaboration d'une forme pharmaceutique* (Doctoral dissertation, Faculté de Génie Mécanique et de Génie des Procédés).

-N-

Nedjai, I. Nedjai, S. (2017). Activité antimicrobienne des huiles essentielles. Mémoire de Master, Université A. MIRA – Bejaia, Algérie.

Référence bibliographique

NOUIOUA, F. E., & GHERABI, S. (2021). *Screening biologique et phytochimique du genre Thymus* (Doctoral dissertation, UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M' SILA).

-O-

Oulebsir-Mohandkaci, H., Ait Kaki, S., & Doumandji-Mitiche, B. (2015). Essential Oils of two Algerian aromatic plants *Thymus vulgaris* and *Eucalyptus globulus* as Bio-insecticides against aphid *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Wulfenia J*, 22(2), 185-197.

Oulebsir-Mohandkaci, H., Khemili-Talbi, S., Benzina, F., & Halouane, F. (2015). Isolation and Identification of Entomopathogenic Bacteria from Algerian Desert Soil and their Effects against the Migratory Locust, *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758)(Orthoptera: Acrididae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25(3).

-P-

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.

Peronny, S. (2005). *La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (Lemur catta)* (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS).

publié dans 20 ans Sci Dev Net, Edition : Afrique Sub - Saharienne.

-R-

RAHMANI, M. (2017). *Etude physiologique et valorisation des plantes fourragères et médicinales dans la wilaya de Sidi Bel-Abbés, Algérie occidentale: Cas de Fenugrec (Trigonella foenum-graecum L.)* (Doctoral dissertation).

Rajasekar, N., Sivanantham, A., Ravikumar, V., & Rajasekaran, S. (2021). An overview on the role of plant-derived tannins for the treatment of lung cancer. *Phytochemistry*, 188, 112799.

Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K., & Remmal, A. (2003). The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of essential oil research*, 15(5), 356-362.

Rugină, D., Hanganu, D., Diaconeasa, Z., Tăbăran, F., Coman, C., Leopold, L., ... & Pinteă, A. (2017). Antiproliferative and apoptotic potential of cyanidin-based anthocyanins on melanoma cells. *International journal of molecular sciences*, 18(5), 949.

-S-

Salehi, E., Afshar, S., Mehrizi, M. Z., Chehrei, A., & Asadi, M. (2018). Direct reduction of blood serum cholesterol using *Thymus vulgaris* L.: Preliminary biosorption study. *Process Biochemistry*, 67, 155-164.

Sieberi, B. M., Omwenga, G. I., Wambua, R. K., Samoei, J. C., & Ngugi, M. P. (2020). Screening of the Dichloromethane: Methanolic Extract of *Centella asiatica* for Antibacterial Activities against *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. *The Scientific World Journal*, 2020.

Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., & Zhang, Y. (2011). Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and chemical toxicology*, 49(10), 2689-2696.

-T-

Takahashi. T, Kokubo. R and Sakaino. M, 2004. Antimicrobial activities of *eucalyptus* leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate*. *Letters in Applied Microbiology* 39, 60–64

-Y-

Yakhlef, G. (2010). *Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de Thymus vulgaris L. et Laurus nobilis L* (Thèse do doctorat, Université de Batna 2).

Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods for human nutrition*, 59, 113-122.

Yves-Alain B., Janat, A., Mamyrbekova B., Boua B., Fézan, H. Trabi, et Ehouan E. Zaid, B et Tifourghi, H. (2020). Contribution d'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles de thym (*Thymus vulgaris*) contre *Aspergillus niger*. Université Mohamed khider, Biskra, Algérie

-V-

Vasantharaj. S, Sathiyavimal. S, Hemashenpagam. N. 2013. Phytochemical and Antibacterial activity of *Eucalyptus*. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 21(2), Jul – August 43, 237-239

Van Ballegooijen AJ, Beulens JW. (2017). The Role of Vitamin K Status in Cardiovascular Health: Evidence from Observational and Clinical Studies. *Current nutrition reports*. 6(3):197-205.

-Z-

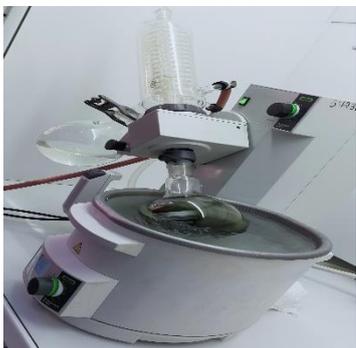
Zaid, B et Tifourghi, H. (2020). Contribution d'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles de thym (*Thymus vulgaris*) contre *Aspergillus niger*. Mémoire de Master, Université Mohamed khider, Biskra, Algérie

Annexes

Les matériels utilisé

Annexe 01

Tableau : Appareillage de laboratoire utilisées.

		
Microscope optique	Agitateur magnétique	Plaque chauffante
		
Vortex	Balance électronique	Rotavapor
		
La hotte aspirante	Etuve	

Les petits outils	Les verreries	Les réactifs
<ul style="list-style-type: none"> -Les boîtes de pétri -Micropipette -Les embouts -Les pipettes pasteur -Bec Bunsen -Les eppendorf -Portoir -Pied à coulisse -Les écouvillons -Barreau magnétique -Fond noir -Pince -Ance de platine -Outil de coupe des disques -Papier wathman -Les bandes de gaz -Microplaque -Spatule -Les lames 	<ul style="list-style-type: none"> -Les tubes à essai -Les flacons en verre -Les Erlenmeyer -Les Bécher -Les pipettes graduées -Entonnoir 	<ul style="list-style-type: none"> -Violet de Gentiane. -Fuschine . -Lugol. -Alcool . -Méthanol . -DMSO (Diméthylsulfoxyde)

Annexe02

Tableau :Les souches bactériennes testées

La souche	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	

Staphylococcus épidermidis



Annexe 03 :

La coloration de gram :

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste Danois Hans Christian Gram (1853-1938) qui mit au point le protocole en 1884.

Technique de coloration qui est la plus utilisée dans l'étude et de la classification des bactéries en 02 grandes groupes : les bactéries à Gram (+) et à Gram (-) . Cette technique repose sur une différence fondamentale entre la composition chimique des parois des bactéries.

Cette méthode permet de déterminer :

- ✓Le type de Gram (+ ou -) .
- ✓La forme des bactéries.
- ✓La taille.
- ✓Le mode de regroupement.

2-1-Matériel nécessaire :

- Lame .
- Violet de Gentiane.
- Lugol .
- Fuschine .
- Alcool.
- Eau déminéralisée.
- Papier filtre.
- Microscope optique (Objectif $\times 40$ et $\times 100$) .

Le protocole :

✓La réalisation du frottis :

- Nettoyer la lame à l'alcool .
- Déposer une goutte d'eau physiologique sur la lame.

- Prélever une colonie bactérienne jeune et pure à l'aide d'une anse de platine stérile . Il n'est pas nécessaire de prendre beaucoup de bactéries
- Frotter la colonie dans la goutte d'eau .
- Le frottis réalisé doit être mince et homogène, étendu sur la lame sans toucher les bords.



Figure 01: la préparation du frottis (photos personnelles 2023).

✓ Séchage :

- La température du laboratoire, si possible.
- Ou bien à chaleur douce : platine chauffante à 37° ou au-dessus de la veilleuse du bec bunsen, à hauteur suffisante. Ne jamais chauffer brutalement.

✓La fixation :

But : tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire adhérer à la lame.

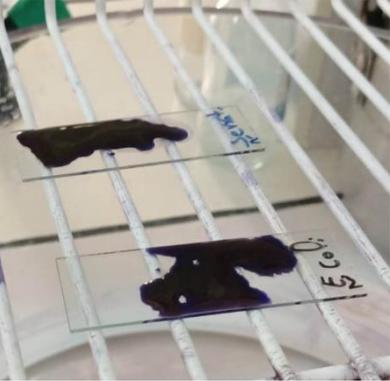
- Fixation par la chaleur : Passer 3 à 4 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec bunsen.

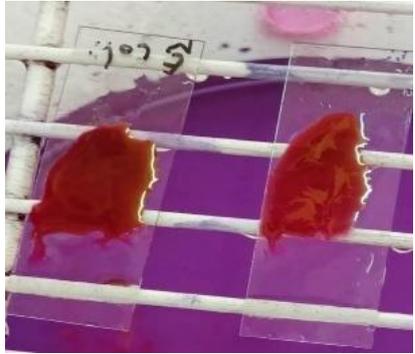


Figure 02 : La fixation par la chaleur (Photos personnelles 2023) .

✓ La coloration :

La coloration permet de distinguer les bactéries Gram + des Gram – grâce à leurs différences de nature de paroi. Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus fine et riche en lipides, alors que les bactéries Gram positifs ont une paroi épaisse et pauvre en lipide.

Étapes	Mode opératoire	Temps	Principe
<p>La première coloration</p>	<p>-Recouvrir le frottis par le crystal violet ou violet de Gentiane.</p> <p>-Rincer à l'eau et récupérer le violet dans un bécher et égoutter.</p>	<p>1 minute</p>	 <p>-Le colorant pénètre dans les cellules bactériennes .</p> <p>-Le Violet de gentiane se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries.</p>
<p>Mordantage</p>	<p>-Recouvrir du Lugol .</p> <p>-Rincer à l'eau distillée et égoutter.</p>	<p>1 minute</p>	 <p>-Le lugol un agent mordant, est ajouté pour stabiliser le crystal violet et permet de fixer ce colorant dans la paroi bactérienne.</p>
<p>Décoloration</p>	<p>-Décolorer à l'alcool à 95° , en laissant couler rapidement l'alcool sur le frottis, tenu verticalement ou en position très inclinée, jusqu'à ce que l'alcool s'écoule non teinté .</p> <p>-Rincer</p>	<p>5 à 10 seconds</p>	 <p>-L'alcool permet d'éliminer le colorant chez une partie de cellules : les bactéries à paroi Gram négative. En effet, ces bactéries disposent d'une mince</p>

	immédiatement à l'eau distillée et égoutter		couche de peptidoglycane et vont redevenir incolores lorsque le colorant sera détaché par l'alcool. Au contraire, les bactéries à paroi Gram positive restent colorées par le cristal violet car elles possèdent une couche de peptidoglycane plus épaisse.
La deuxième coloration	<p>-Recouvrir le frottis par la fushine .</p> <p>- Rincer la lame bien égoutter.</p>	1 minute	 <p>-La fuschine recolore en rose les bactéries précédemment décolorées : les bactéries Gram (-).</p>
Séchage	- Egoutter entre 2 morceaux de papier-filtre et laisser sécher .		

✓ La mise en point :

- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis.
- Observer au microscope et faire la mise au point en forte luminosité (condensateur levé et diaphragme ouvert) **objectif ×100**.

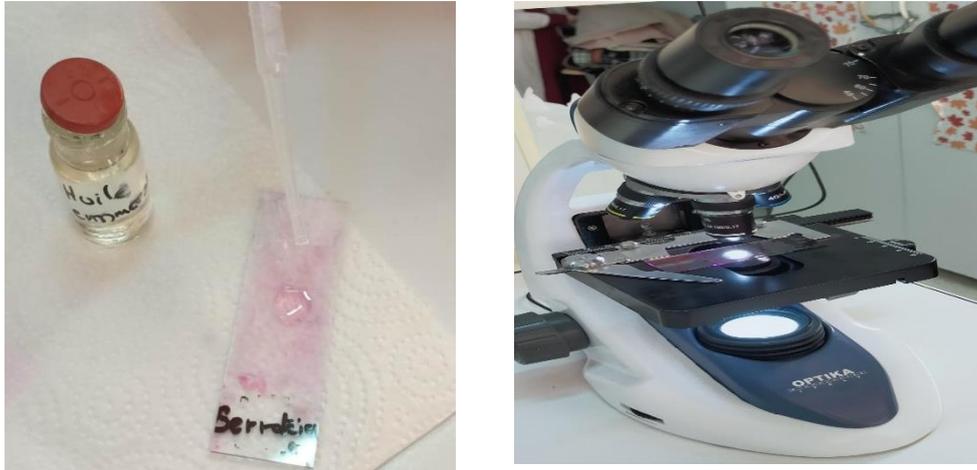


Figure 03 : la mise en point (photos personnelles 2023)

✓ La lecture microscopique

On peut noter la morphologie des bactéries et la coloration de celles-ci :

- Les bactéries violettes sont Gram (+).
- Les bactéries roses sont Gram (-).

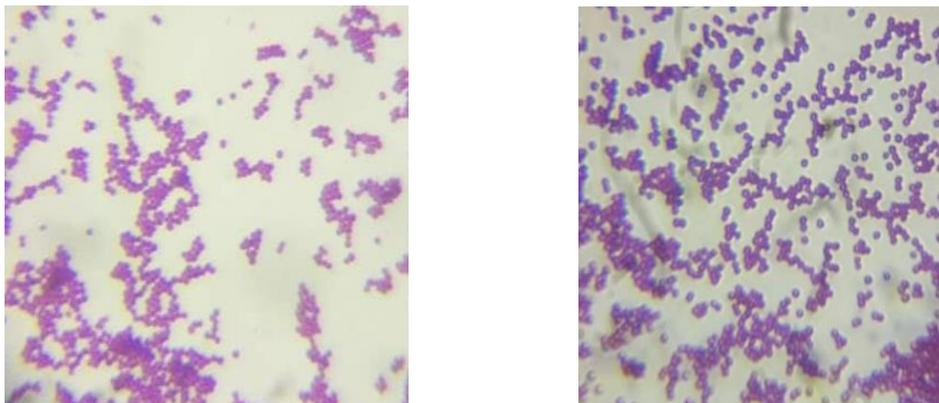


Figure 04: Les bactéries sous microscope (photos personnelles 2023)

Annexe 04

la préparation les milieux de culture et leurs compositions

✓ Les milieux solides

Milieu	Composition	Préparation
Gélose nutritif (GN)	<ul style="list-style-type: none"> -Extrait de viande : 1g/L -Extrait de levure : 2,5g/L -Peptone : 5g/L -Chlorure de sodium : 5g/L -Agar-agar : 15 g -ph =7 	<ul style="list-style-type: none"> -28 g de milieu déshydraté . - 1 litre d'eau distillée. - Mélanger et après stériliser à autoclave pendant 20 minutes et répartir en flacons.
Muller – Hinton (MH)	<ul style="list-style-type: none"> -Hydrolysate acide de caséine : 17,5g -Extrait de viande : 2 g -Amidon de maïs : 1,5g -Infusion de viande de bœuf : 300 ml -ph = 7,3± 0,2 	Prêt à l'emploi .
Chapman	<ul style="list-style-type: none"> -Peptone : 10 g -Extrait de viande de bœuf : 1 g -Chlorure de sodium : 75g -Mannitol : 10 g -Rouge de phénol : 0,025g -Gélose : 15 g -ph : 7,4 ± 0,2 	<ul style="list-style-type: none"> - 111 g de milieu déshydraté. -1 litre d'eau distillée. -Mélanger et stériliser à autoclave pendant 20 minutes .
Mac Conkey	<ul style="list-style-type: none"> -Peptone pancréatique de gélatine : 17g -Peptone pancréatique de caséine : 1,5 g -Peptone peptique de viande : 1,5 g -Lactose : 10 g -Chlorure de sodium : 5 g -Sels biliaires : 1,5 g -Rouge neutre : 30 mg -violet de Gentiane : 1mg -Agar : 13,5 g -ph = 7,1 ± 0,2 	Mettre 51,5 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée. Faire bouillir jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes.

✓Les milieux liquides

Milieu	Composition	Préparation
Bouillon nutritif (BN)	- <u>Peptone</u> : 10 g - <u>Extrait de bœuf</u> : 1 g - <u>Extrait de levure</u> : 2g - <u>Chlorure de sodium</u> : 5g - <u>ph</u> : 6.8 ± 0.2	-8 g de milieu déshydraté. - 1 litre d'eau distillée. - Agitation et stérilisation à autoclave pendant 15 minutes.
Bouillon Muller-Hinton (MH)	- <u>Hydrolysate de caséine</u> : 17,5 g - <u>Infusion de viande</u> : 2 g - <u>Amidon</u> : 1,5 g - <u>ph</u> = $7,4 \pm 0,2$	-21 g de milieu déshydraté. -litre d'eau distillée. -Agitation et stérilisation à autoclave pendant 15 minutes.
Eau physiologique	-Eau distillée. -Chlorure de sodium (NaCl) .	-9 g de NaCl . - 1 litre d'eau distillée. -Agitation jusqu'à l'homogénéisation du solution.

			
Gélose nutritif	Mac Conkey	Chapman	Gélose MH

Annexe 05

Standard Mec Ferland

Les normes McFarland sont utilisées comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes pour que le nombre de bactéries se situe dans une gamme de concentrations donnée afin de normaliser les tests microbiens.

✓Composition :

Standard	1% BaCl ₂ (ml)	1% H ₂ SO ₄ (ml)	Approximatif M bactérien suspension / ml
0,5	0,05	9,95	$1,5 \times 10^8$

✓Procédures :

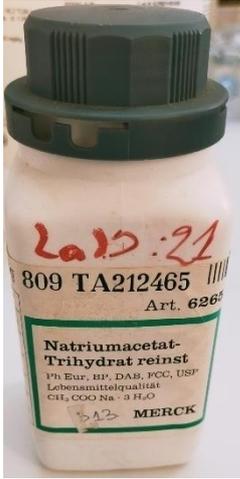
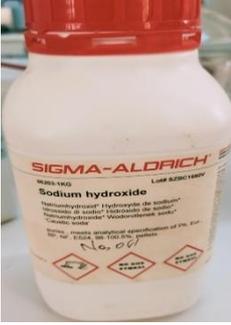
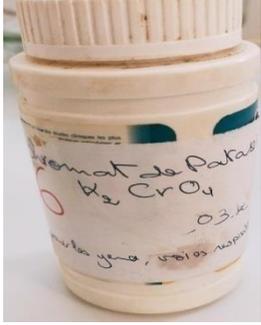
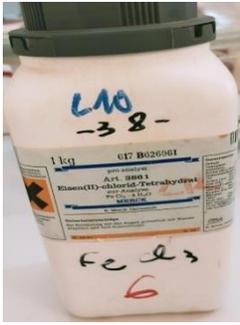
1. Mélanger la solution de McFarland Standard sur un mélange vortex avant l'examen. Assurez vous que McFarland Standard est aliquoté dans un tube c'est la même taille et le même diamètre que le tube utilisé pour préparer la suspension d'essai.
2. Préparez une suspension d'essai en obtenant une culture pure de l'organisme d'essai et inoculer Un bouillon approprié.
3. En présence d'un bon éclairage, visuellement comparer la turbidité de la suspension d'essai avec celle de la norme McFarland en comparant la clarté des lignes sur le Wickerham carte.
4. Si la suspension d'essai est trop légère, inoculer avec des organismes supplémentaires ou incubé le tube jusqu'à ce que la turbidité corresponde à celle de la norme. Si une dilution est nécessaire, utiliser une pipette stérile et ajouter suffisamment de bouillon ou de solution saline pour obtenir une turbidité qui correspond à celle de la norme.



Figure 05 : la préparation du Standard MecFerland (photos personnelles 2023)

Annexe 06

Les réactifs de screening phytochimique :

			
<p>HCL</p>	<p>Acide trichloroacétique</p>	<p>Sodium acétate trihydraté</p>	<p>Acide ascorbique</p>
			
<p>Acide acétique</p>	<p>Hydroxide de sodium</p>	<p>Chromat de potassium</p>	<p>Chlorure ferrique</p>
			
<p>Ether de pétrole</p>	<p>Copeaux de magnésium</p>		

Annexe 07

La revivification des souches bactériennes :

La revivification est une étape très importante dans la microbiologie.

Cette étape se fait en prenant quelques colonies bactériennes et les ensemercer dans des tubes contenant 10 ml de **BN** suivie d'une incubation à 37C° pendant 24h .

Pour vérifier la pureté des souches , après l'enrichissement des bactéries dans le **BN** , en ensemercer a l'aide d'un écouvillon par des stries dans le milieu solide et incubées à 37 C° pendant 24 à 48 h .



Figure 06 : la revivification des souches (photos personnelles 2023)

Annexe 08

Tableau : Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* sur les souches bactériennes testées

		Les dilutions de l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i> (10 µL)						Témoin
		D (mm)						
Souches bactériennes		ExMet pure	10 mg/mL	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL	DMSO
G-	<i>E.coli</i>	19.3±1.91	16.9±0.3	13.6±0.5	11.2± 0.1	8.6± 0.3	0	0
	<i>S.marsescens</i>	16.3±0.6	13.7±1.3	10.3±1.3	7.4±0.6	6.3±0.4	0	0
	<i>K.pneumoniae</i>	17.83±0.15	16.4 ±0.01	14.1±0.05	8.6 ±0.05	11.4 ±0.05	0	0
G+	<i>S.aureus</i>	25.1±0.1	19.8 ± 0.1	17.5 ± 0.05	10.8 ± 0.05	10.5 ±0.05	0	0
	<i>S.épidermidis</i>	22.6±0.1	17.3 ± 0.1	16.3 ± 0.1	10.5± 0.1	10.1±0.05	0	0

Annexe 09

Activité antibactérien de l'extrait methanolique de *Thymus vulgaris* sur cinq souches bactériennes.(mm)

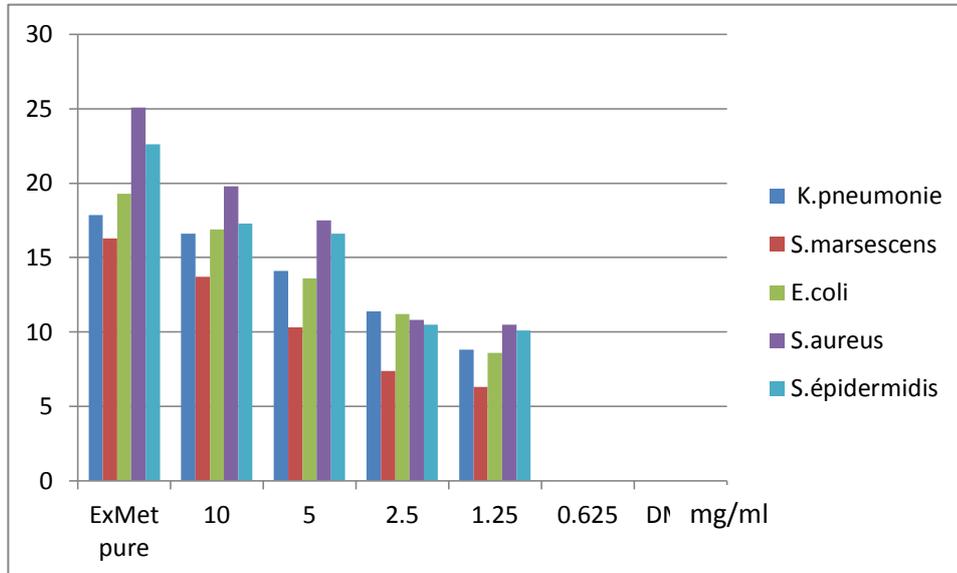


Figure 08 :Présentation de l'activité antibactérienne de l'extrait methalonique de *Thymus vulgaris*.