

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE DE THYM.
CARACTERISATION ET EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.

Présenté par : AOMARI LILA

SEHAKI CHABHA

Soutenu publiquement, le 28 / juin / 2018, *devant le Jury composé de :*

Mme DERRIDJ Fazia	Maître de conférences A	UMMTO	Président
Mme AYATI Fadila	Maître de conférences B	UMMTO	Encadreur
Melle TOUZOUIRT Saida	Maître de conférences B	UMMTO	Co-Encadreur
Mme KHALDI Nassima	Maître assistant A	UMMTO	Examineur
M ABDOUN Amar	Pharmacien biologiste	CHU.TO	Examineur

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu, le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

اللهم لك الحمد لجلال وجهك وعظيم سلطانك.

Ce travail a été réalisé au laboratoire pédagogique de chimie pharmaceutique, du département de chimie de la faculté des sciences, à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou sous la direction de madame AYATI Fadila et mademoiselle TOUZOUIRT Saida.

Nous exprimons nos respectueux remerciements et notre sincère gratitude à notre promotrice madame AYATI Fadila et notre Co-promotrice mademoiselle TOUZOUIRT Saida, pour nous avoir proposées ce thème, nous avoir guidées tout au long de ce travail, pour leur compétence, leur gentillesse, leur patience et leurs conseils précieux qui ont permis d'accomplir à bon terme cette étude.

Nous adressons notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements à docteur Abdoun pharmacien spécialisé en microbiologie, pour ses encouragements, son aide, ses conseils durant notre travail au laboratoire de microbiologie de la faculté médecine,

Nous remercions vivement Madame F.DERRIDJ maître de conférences à l'UMMTO, nous sommes touchées de l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury.

Nos plus vifs remerciements s'adressent à Madame N.KHALDI maître assistante à l'UMMTO et docteur Abdoun, pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les examinateurs. Veuillez accepter nos profonds remerciements pour votre présence dans ce jury.

Nous remercions profondément le Professeur AZZAME de nous avoir accueillies au sein du Laboratoire microbiologie de la faculté médecine et pour qui nous exprimons toute notre reconnaissance.

Notre profonde reconnaissance va aux ingénieures de laboratoire de chimie pharmaceutique, et toutes les personnes qui ont contribué à accomplir ce travail au sein de ce laboratoire.

Notre immense gratitude s'étend également à madame MOGHRANI, responsable du laboratoire de génie de la réaction de l'USTHB à Alger, pour son autorisation à accomplir notre étude au sein de son laboratoire.

Nos vifs remerciements vont à monsieur ALOUADJE, spécialiste en pharmacognosie et monsieur BEN GHANEM Abd El Kadar enseignant au département de biologie de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'UMMTO, pour leur aide durant notre travail.

Nous adressons nos immenses remerciements, à tous nos enseignants, qui nous ont donné les bases de la science et tous les apports nécessaires pour l'accomplissement de notre formation.

Enfin, il nous est agréable de terminer en remerciant toutes les personnes, qui de près ou de loin nous ont apporté leur soutien, leur conseil et leur contribution pour achever ce travail.



Dédicaces

Grâce au dieu, le tout puissant, nous avons pu terminer ce travail que je dédie :

A mes très chères parents, qui sont toujours près de moi pour m'encourager, me soutenir et me fournir tous le nécessaire pour réaliser ce mémoire, que se soit moralement ou matériellement. *Vous êtes mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant. Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous MES CHERS que je le dois.*

A mes sœurs que j'estime beaucoup.

A toute ma famille

A ma binôme, et à toute sa famille.

Ains qu'à tous mes amis.

SEHAKI CHABHA



DEDICACE

Je remercie DIEU le tout puissant pour nous avoir guidé et donné le courage pour achever ce travail que je dédie :

A mes chères parents honorables, aimables pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A la mémoire de mon grand père maternel et la mémoire de mon grand père paternel qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite.

A ma grand-mère maternelle et ma grand-mère paternelle pour leur sympathie et leurs encouragements qu'elles m'ont apporté. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

*A mes très chères sœurs Malika, Ghania, Fatiha et Kahina.
A mes chers frères Ali et Salem.*

A mes adorables nièces et neveux

A tous mes oncles, mes tantes et tous les membres de ma famille.

A ma binôme Chabha avec laquelle j'ai partagé les bons moments.

A tous mes amis que j'aime du fond de mon cœur, qui n'ont cessé, a aucun moment de me soutenir et m'encourager.

A tous les étudiants de la spécialité chimie pharmaceutique.

LILA

Liste des abréviations et des symboles

ADH : Arginine Dihydrolase.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ANOVA : ANalysis Of Variance (l'analyse de la variance).

API : Analytical profile index.

ATCC : American Type Culture Collection.

BGN : Bacilles à gram négatif.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CG/SM : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.

CHU : Centre Hospitalo-universitaire.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMI : Concentration minimal inhibitrice.

CPG : Chromatographie en phase gazeuse.

E. coli : Escherichia coli.

Fcrit : F critique.

Fobs : F observé.

Fox : Céfoxitine

Glu : Glucose.

GN : Gélose nutritive.

HE : Huile essentielle.

HEs : Huiles essentielles.

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance.

ISO : Organisation International de Normalisation.

Lac : Lactose.

LDC : Lysine Décarboxylase.

MH : Muller Hinton.

MODDE : Modélisation et Optimisation de Plans d'Expériences.

MPE : Méthodologie des Plans d'Expériences.

ODC : Ornithine Décarboxylase.

ONPG : Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside.

R_{HE} (%) : Rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage.

Rif : Rifampicine.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

Sac : Saccharose.

TDA : Tryptophane Désaminase.

TSI : Triple Sugar Iron.

VP : Voges Proskauer.

Liste des figures

Figure 1 : Quelques composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles.....	4
Figure 2 : Thymus Capitatus	12
Figure 3 : Montage de l'hydrodistillation de type Clevenger	15
Figure 4 : Réfractomètre d'Abbe	16
Figure 5 : Principe de la méthode de diffusion par disque.....	20
Figure 6 : Dispersion de la réponse observée en fonction de la réponse prédite	24
Figure 7 : Histogramme de l'influence des coefficients sur le rendement en HE.....	25
Figure 8 : Evolution des résidus en fonction des réponses prédites.....	27
Figure 9 : Valeurs de Q^2 et R^2 en fonction de la réponse.....	27
Figure 10 : Taux d'humidité de thymus capitatus.....	28
Figure 11 : Teneur en eau des feuilles de thymus capitatus après séchage.....	28
Figure 12 : Test d'identification chimique de thymol.....	30
Figure 13 : Résultats de l'aromatogramme obtenus sur les boites de pétris	32
Figure 14 : Histogramme des diamètres d'inhibition de chaque produit en fonction des souches testée	34
Figure 15 : Superposition des deux chromatogrammes de l'HE de T. capitatus et le T. zygis...	36

Liste des tableaux

Tableau 1 : Localisation de quelques espèces de genre <i>Thymus</i> en Algérie	6
Tableau 2 : Principaux constituants des huiles essentielles (HEs) de différentes espèces de <i>thymus</i>	6
Tableau 3 : Produits chimiques utilisés	11
Tableau 4 : Matériel de laboratoire utilisé durant le travail.....	12
Tableau 5 : Tableau représentant les souches testées	13
Tableau 6 : Domaine de variation des paramètres pour le plan composite.....	14
Tableau 7 : Concentrations utilisées pour la réalisation de test de la CMI.....	21
Tableau 8 : Résultats de plan d'expériences	23
Tableau 9 : Analyse de la variance	26
Tableau 10 : Caractéristiques de la réponse optimale.....	27
Tableau 11 : Ensemble des solutions données par le module optimizer.....	28
Tableau 12 : Caractéristiques physiques et organoleptique de l'HE extraite de <i>thymus capitatus</i> et de quelques espèces de <i>thym</i> selon la littérature et les normes.....	30
Tableau 13 : Résultats de l'identification des souches	31
Tableau 14 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition des HE et de <i>thymol</i> commercial vis-à-vis des souches testées	33
Tableau 15 : Résultats de la CMI pour l'HE de <i>thymus capitatus</i>	34
Tableau 16 : Comparaison entre les trois espèces de <i>thym</i> (<i>T.capitatus</i> , <i>T.vulgaris</i> , <i>T.zygis</i>)...	35
Tableau 17 : Comparaison de l'activité antimicrobienne entre l'HE de <i>T.capitatus</i> et <i>T. zygis</i>	37

Résumé :

L'objectif de notre étude est d'extraire l'HE de thymus capitatus par hydrodistillation de type Clevenger. L'optimisation des conditions opératoires par la méthodologie des plans d'expériences est effectuée. La caractérisation de celle-ci pour vérifier sa qualité par des analyses physiques, sensoriels, chromatographiques est réalisée. Enfin l'évaluation de son activité antimicrobienne vis à vis de différentes souches microbiennes est faite. Les résultats ont montré que l'huile essentielle obtenue est un liquide jaune pâle, avec une odeur aromatique. Le rendement maximal est atteint pour la forme non broyée, il est de 1.6% pour une durée d'extraction d'une heure. L'analyse par CPG a permis de détecter la présence de 16 composés dont le majoritaire se trouve à un pourcentage de 82,96 %. L'étude du pouvoir antimicrobien de cette huile montre qu'elle possède une activité antimicrobienne importante.

Mots clés : hydrodistillation Clevenger, plan d'expérience, huile essentielle, plantes aromatiques, rendement, activité antimicrobienne.

Abstract :

The aim of our study is to extract essential oil of the thymus capitatus by hydrodistillation with type Clevenger. While optimizing operational conditions by a designed experiment and the characterization of this oil in order to verify its quality using physical, sensory, and chromatographic analyses. Finally, the evaluation of its antimicrobial activity against different microbial strains. The results showed that, the essential oil obtained is pale yellow liquid, with aromatic odor. The maximum yield calculated is reached for unground form; it is 1.6% for an hour. The analysis by GPC detected the presence of 16 compounds, which the majority one has a percentage of 80%. The evaluation of antimicrobial power showed that this oil possesses an important antimicrobial activity.

Key words: Hydrodistillation Clevenger, designed experiment, essential oil, aromatic plants, yield, antimicrobial activity.

Sommaire

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

Partie1 : Etude bibliographique.

Chapitre 1: Généralités sur les huiles essentielles et le thym.

1. Huiles essentielles.....	2
1.1. Définition des HES	2
1.2. Localisation des HES dans la plante	2
1.3. Propriétés physico-chimiques des HES	2
1.4. Composition chimique des HES	2
1.4.1. Composés terpéniques	2
1.4.2. Composés aromatiques	3
1.5. Notion de chémotype.....	3
1.6. Usage et activités thérapeutiques des HES	3
1.7. Toxicité des HES.....	4
2. Matériel végétal : Le thym.....	4
2.1. Classification.....	4
2.2. Présentation et description de la famille des lamiacées	5
2.3. Répartition géographique.....	5
2.4. Usage et vertus thérapeutique du thym.....	6
2.5. Composition chimique de l'HE du thym	6

Chapitre 2 : Extraction et analyse des huiles essentielles et méthodologie d'optimisation.

1. Techniques d'extraction.....	7
1.1. Techniques conventionnelles	7
1.2. Techniques innovantes	7
2. Méthodologie des plans d'expériences	8
2.1. Définition des plans d'expériences	8
2.2. Terminologie	8
2.3. Méthodologie de surface de réponse.....	8
2.3.1. Plan composite	8
2.3.2. Éléments d'un plan composite	9
2.3.3. Modèle mathématique postulé.....	9

3. Analyses physico-chimiques et chromatographiques des HES	9
3.1. Analyse organoleptique	9
3.2. Analyse physique	10
3.3. Analyse chimique	10
3.4. Analyse chromatographique.....	10
4. Analyse microbiologique	10
4.1. Méthodes qualitatives.....	10
4.2. Méthodes quantitatives.....	10

Partie 2 : Etude expérimentale.
Chapitre 3 : Matériel et méthodes.

1. Matériel	11
1.1. Matériel chimique (réactifs et solvants).....	11
1.2. Matériel de laboratoire	12
1.3. Matériel biologique	12
1.3.1. Matériel végétal	12
1.3.1.1. Nomenclature et description botanique du genre thymus.....	12
1.3.1.2. Récolte, séchage et identification du matériel végétal.....	12
1.3.1.3. Evaluation de taux d'humidité	13
1.3.2. Matériel microbiologique	13
1.3.2.1. Souches microbiennes testées	13
1.3.2.2. Milieux utilisés pour le test.....	14
2. Méthodologie d'optimisation.....	14
2.1. Construction du plan d'expérience.....	14
2.1.1. Choix des facteurs et leur domaine de variation.....	14
2.1.2. Choix de la réponse.....	14
2.1.3. Construction du plan	14
3. Expérimentation	15
3.1. Méthode d'extraction	15
3.2. Détermination du rendement	15
3.3. Caractérisation de l'HE	16
3.3.1. Caractérisation organoleptique et physique	16
3.3.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse.....	16

3.4. Identification chimique de thymol	17
3.5. Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de thymus capitatus	17
3.5.1. Vérification de la pureté des bactéries et identification des souches.....	17
3.5.2. Méthode de diffusion sur milieu solide (aromatogramme).....	18
3.5.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	20
3.5.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide	21
3.6. Etude comparative	21
3.6.1. Comparaison avec l'HE de thymus vulgaris.....	22
3.6.2. Comparaison avec l'HE de thymus zygis	22

Chapitre 4 : Résultats et discussion.

1. Etude statistique des résultats d'extraction	23
1.1. Validation du modèle mathématique	23
1.1.1. Adéquation du modèle	24
1.1.2. Facteurs significatifs.....	24
1.1.3. Analyse de la variance.....	25
1.1.4. Etude des résidus	26
1.2. Modélisation de la réponse	27
1.3. Phase d'optimisation.....	27
2. Calcul du taux d'humidité.....	28
3. Evolution de rendement d'extraction.....	29
4. Caractérisation de l'HE de thym.....	29
4.1. Caractérisation physique et organoleptique	29
4.2. Analyse chromatographique.....	30
5. Résultat de l'identification chimique de thymol.....	30
6. Résultat de l'étude de l'activité antimicrobienne.....	31
6.1. Identification des souches	31
6.2. Résultats de l'aromatogramme.....	32
6.3. Résultats de la méthode des CMI et CMB	34
7. Résultats de l'étude comparative	35
Conclusion générale.....	37

Références bibliographiques.

Glossaire.

Annexes.

Introduction générale

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, et certainement bien avant, les plantes ont servi de pharmacothèque naturelle et pragmatique pour l'homme. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées dans le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains.

L'Afrique dispose d'une diversité importante de plantes médicinales, qui constituent des ressources précieuses pour la grande majorité des populations rurales, où plus de 80% de cette dernière s'en sert pour leurs besoins de santé [1].

Avec une superficie de 2 381 741 km², l'Algérie est le plus grand pays riverain de la Méditerranée. Il est reconnu par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des terroirs du pays [2].

Dans le bagage chimique des plantes, les huiles essentielles, représentent des molécules de fortes valeurs, utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires [3].

Dans le but de contribuer à la valorisation du patrimoine végétal de notre pays. Ce travail porte sur l'optimisation, du rendement d'extraction de l'huile essentielle de thym. Cette plante appartenant à la famille des lamiacées, *thymus capitatus* est récolté localement dans la région ouest de Tizi-ouzou. Son choix est basé sur la disponibilité, la spontanéité et l'usage de cette plante dans nos traditions médicinales locales.

Ce mémoire est structuré en deux parties :

La première partie est une synthèse bibliographique comprenant deux chapitres, le premier relate des généralités sur des huiles essentielles et le thym, le deuxième recense l'étude des méthodes d'extraction et d'analyse des huiles essentielles ainsi que la méthodologie d'optimisation.

La seconde est la partie pratique qui est consacrée à la:

- Description des produits, du matériel et des différentes méthodes utilisés pour extraire et caractériser l'huile essentielle de thym. Une évaluation de l'activité antimicrobienne de cette huile a fait l'objet de cette partie.
- Présentation des résultats de l'expérimentation, et l'interprétation de ceux-ci en se basant sur des références bien définies.

Enfin, une conclusion générale résumant l'ensemble des résultats obtenus et dégagant les principales perspectives.

Partie 1: Etude bibliographique

Chapitre 1: Généralités sur les huiles essentielles et le thym

1. Huiles essentielles :

1.1. Définition des HE_s :

Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme « essentielle » désigne la caractéristique principale de la plante à travers ces exhalaisons [4].

Selon la pharmacopée : l'huile essentielle est un « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage ».

1.2. Localisation des HE_s dans la plante :

Les huiles essentielles sont particulièrement abondantes chez certaines familles : Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae...etc. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices, et s'accumulent en générale dans les cellules glandulaires spécialisées, souvent situés sur ou à proximité de la surface des tissus de plantes recouvertes d'une cuticule [5].

1.3. Propriétés physico-chimiques des HE_s :

- Les HE_s sont le plus souvent liquides à température ambiante, incolores, d'une odeur forte et très caractéristique. Elles sont volatiles, de nature hydrophobe, totalement solubles dans les alcools, l'éther et dans les huiles végétales et minérales, et sont entraînable à la vapeur.
- Leur densité est, en général, inférieure à celle de l'eau.
- La plupart des HE_s dévient la lumière polarisée. Très altérables, sensibles à l'oxydation.
- Elles se caractérisent aussi par un pouvoir rotatoire, une viscosité, un point d'ébullition un point de congélation [4, 6, 7].

1.4. Composition chimique des HE_s :

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. Ces composés appartiennent à deux familles chimiques bien distinctes à savoir : les composés terpéniques et les composés aromatiques [8].

1.4.1. Composés terpéniques :

Ce sont des composés issus de couplage de plusieurs unités isopréniques. Les terpènes les plus rencontrés dans les HE_s, sont les terpènes les plus volatiles c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : ce sont les mono et les sesquiterpènes.

- **Monoterpènes** : tel que myrcène, α et γ -terpinène ou sabinène.
- **Sesquiterpènes** : tel que : β -caryophyllène, α -humulène...etc.

Exceptionnellement quelques **diterpènes** peuvent se retrouver dans les huiles essentielles [4, 9].

1.4.2. Composés aromatiques :

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les monoterpènes et sesquiterpènes.

Ce sont souvent des allyles et des propénylphénols, et rarement des aldéhydes rencontrés dans certaines huiles essentielles d'apiacées (anis, persil...). Des composés tels que la vanilline et l'anthranilate de méthyle peuvent être également rencontrés [4, 6].

En plus de ces composés, plusieurs molécules fonctionnalisées peuvent être présentes :

Les alcools : (géraniol, linalol, Bornéol...), **les aldéhydes** : le plus souvent sont acycliques (citronellal, géraniol...), **les cétones** : acycliques (tagétone), monocycliques (menthone, carvone)...etc.

1.5. Notion de chémotype :

Le chémotype d'une H.E est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'HE. Il permet de distinguer l' H.E extraite d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente [1].

Cette classification dépend des facteurs liés directement aux conditions de vie spécifiques de la plante à savoir le pays, le climat, le sol et la période de récolte qui peuvent influencer la composition de l'huile essentielle [10].

1.6. Usage et activités thérapeutiques des HES :

- Dans le domaine de cosmétique et agro-alimentaire, les HES sont employées en tant qu'agent conservateur grâce à leurs propriétés antimicrobiennes qui permettent d'augmenter la durée de conservation du produit [5, 11]. Les HES ont été employées dans le domaine pharmaceutique pour le traitement des infections des yeux et des oreilles, les gingivites, les hémorroïdes et pour arrêter la transpiration ainsi dans la désinfection de la pulpe dentaire, et dans le traitement et la prévention des caries [12].

- **Activité antimicrobienne (Activité antibactérienne, Activité antifongique)** : Dans les années 1980, plusieurs études sur les HES ont été effectuées pour prouver leurs effets antimicrobiens. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines [7].

Le pouvoir antifongique des HES a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes et contre les dermatophytes et champignons pathogènes et opportunistes [7]. La figure 2 montre quelques composés impliqués dans l'activité antibactérienne des HES.

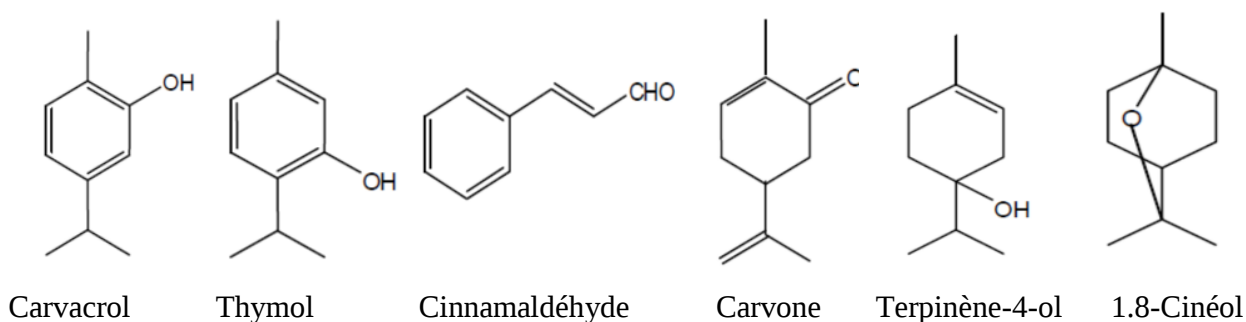


Figure 1 : Quelques composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles [1].

Les huiles essentielles sont également utilisées pour leur activité anti-oxydante, anti-inflammatoire et anti-tumorale.

1.7. Toxicité des HES :

Les huiles essentielles sont des produits à risque. La toxicité provient de la présence de certaines molécules aromatiques pour lesquelles des risques ont été identifiés suite à des tests : la famille **des cétones** : (une neurotoxicité et un risque abortif), **la famille des phénols et des aldéhydes** : (dermocausticité, hépatotoxicité, irritation des muqueuses respiratoires, déclenchement de crises d'asthmes), **la famille des furocoumarines et pyrocoumarines** : (réactions érythémateuses sous l'effet prolongé du soleil), **la famille des monoterpènes** : (enflamme et détériorer, les néphrons) [1, 13].

Dans le monde actuel des produits naturels, il convient de ne pas utiliser ces substances de façon abusive. Comme pour un médicament, il existe pour chaque huile essentielle un équilibre entre le bénéfice et le risque qui doit aussi être envisagé en fonction du sujet [13].

2. Matériel végétal : Le thym.

2.1. Classification :

La classification botanique, selon le botaniste **Quézel, (1963)** [14] est la suivante :

- Règne: Plantae
 - Sous-règne : Tracheobionta
 - Embranchement: Magnoliophyta
 - Sous-embranchement: Magnoliophytina
 - Classe: Magnoliopsida
 - Sous-classe : Asteridae
 - Ordre: Lamiales
 - Famille: Lamiaceae
 - Genre: Thymus

2.2. Présentation et description de La famille des lamiacées :

La famille des lamiacées est l'une des familles les plus utilisées dans le monde, elle est très diversifiée avec 224 genres et environ 4000 espèces [5, 15].

La tige des Lamiacées est à section carrée, on peut donc sentir quatre angles en la faisant tourner entre ses doigts. Les feuilles sont disposées par deux, face à face le long de la tige, on dit qu'elles sont opposées. Chaque paire de feuilles est orientée en angle droit par rapport à la paire au-dessus et en dessous d'elle sur la tige, si bien qu'en regardant une Lamiacée du dessus, les feuilles forment une croix [16].

2.3. Répartition géographique :

• **Dans le monde :** Le thym est distribué dans le nord-ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et la péninsule du Sinaï en Egypte. Passant par les régions arides de l'Asie occidentale jusqu'à Himalaya. Dans le nord il pousse en Sibérie et en Europe nordique [1, 4].

• **En Algérie :** Le Thymus comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides. Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces. Le tableau 1 montre la localisation des principales espèces de thym en Algérie [5].

Tableau 1 : Localisation de quelques espèces de genre *Thymus* en Algérie [5].

Espèces	Découverte par	Localisation
Thymus capitatus	Hoffman et Link Rare.	Dans la région de Tlemcen.
Thymus Fontanasii	Bois et Reuter.	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie-Tunisie.
Thymus commutatus	Battandier	Endémique Oran
Thymus numidicus	Poiret	Assez rare dans : La grande et la petite Kabylie..

2.4. Usage et vertus thérapeutiques du thym :

Cette plante aromatique très odorante est considérée comme l'un des remèdes les plus efficaces contre le rhume, la grippe et l'angine, elle calme les toux quinteuses, et diminue les sécrétions nasales. Elle contribue aussi dans le traitement de l'hypertension et les problèmes intestinaux et en usage externe pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies [5].

2.5. Composition chimique de l'HE du thym :

L'essence du thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives [5]. Leur composition renferme des alcools, des phénols des aldéhydes, des cétones, des esters et quelques dérivés du phényle propane.

Le thymol et le carvacrol sont les plus importants constituants du genre *Thymus* (tableau 2) sauf pour le thymus serpyllum qui est caractérisé par l'absence de ces composés [17].

Tableau 2 : Principaux constituants des huiles essentielles (HEs) de différentes espèces de thymus.

	Espèces	Composés majoritaires	Composition (HE)	références
Thym	T. officinalis	thymol carvacrol γ -terpinène <i>p</i> -cymène	10 à 64% 2 à 11% 2 à 31% 10 à 56%	[18]
	T. herbabarone	thymol <i>p</i> -cymène	50.3 % 27.6 %	[19]
	T. capitatus	Carvacrol <i>p</i> -cymène γ -terpinène	70.92% 6.34% 4.92%	[20]

Chapitre 2: Extraction et analyse des HEs et méthodologie d'optimisation

1. Techniques d'extraction.

Le procédé d'obtention des huiles essentielles intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique. Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales [21].

1.1. Techniques conventionnelles :

• Hydro-distillation :

Le principe de l'hydro-distillation consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau (aujourd'hui remplacé par un Clevenger). Ce mélange solide-liquide est ensuite chauffé jusqu'à ébullition, sous pression atmosphérique, où la chaleur permet la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible, qui peut être évaporé, puis condensé dans un réfrigérateur. L'essence se sépare de l'hydrolat par la différence de densité [7].

• Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Ce procédé consiste à récupérer l'huile essentielle des plantes en faisant passer à travers ces dernières un courant de vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant puis condensés et récupérés par décantation. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante [1, 4].

1.2. Techniques innovantes :

• Extraction par micro-ondes :

Le procédé d'extraction par micro-ondes consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Cette technique présente les avantages suivants: rapidité, économie du temps, d'énergie et d'eau, extrait dépourvu de solvant résiduel [12].

• Extractions au CO₂ supercritique :

Elle repose sur l'utilisation du gaz carbonique qui dans certaines conditions de pression et de température se comporte comme un solvant. Le produit à traiter est placé dans un extracteur traversé par le flux de CO₂ supercritique (plus de 74 bars et de 31 °C), le CO₂ est caractérisé par une grande diffusivité, ce qui lui confère une bonne aptitude à la diffusion, et une densité élevée qui le dote d'une capacité de transport et d'extraction importante. Le fluide se charge en

composé extrait, puis il est détendu, passe en phase gazeuse et se sépare du composé extrait. Ce dernier est recueilli dans un séparateur [21].

2. Méthodologie des plans d'expériences :

L'optimisation est présente partout, là où il y a nécessité de rationaliser la conception d'un système ou le déroulement d'un processus qu'il soit industriel ou autre. Elle peut être sommairement définie comme étant une opération permettant de trouver le meilleur de quelque chose (maximum de produit, de rendement, ou minimum de coût d'énergie,...). L'une des méthodes d'optimisation la plus utilisée est la méthodologie des plans d'expériences [6].

2.1. Définition des plans d'expériences :

La théorie des plans d'expériences assure les conditions pour lesquelles on obtient la meilleure précision possible avec le minimum d'essais. On a donc le maximum d'efficacité avec le minimum d'expériences et par conséquent le coût minimum [22]. Les plans d'expériences sont des techniques qui permettent de quantifier les effets de divers facteurs sur une réponse et de les optimiser dans des domaines expérimentaux bien déterminés [23].

2.2. Terminologie :

- **Facteurs** : ce sont des grandeurs supposées influentes sur les variations des réponses.
- **Niveau** : c'est la valeur donnée à un facteur pour réaliser une expérience.
- **Domaine d'étude** : c'est la partie expérimentale sélectionnée par l'expérimentateur pour réaliser son étude. Il est défini par les niveaux hauts et les niveaux bas de tous les facteurs et éventuellement par des contraintes entre les facteurs.
- **Réponses** : ce sont des grandeurs étudiées ou grandeurs de sortie [22].

2.3. Méthodologie de surface de réponse :

La méthodologie de surface de réponse fait partie des plans d'expériences utilisés pour l'optimisation. C'est une modélisation empirique technique consacrée à l'évaluation de la relation d'un ensemble de facteurs expérimentaux contrôlés et observés avec les résultats [23].

Parmi les plans utilisés dans cette méthodologie les plus employés sont : les plans composites, les plans de Box-Behnken et les plans de Doehlert.

2.3.1 . Plan composite :

Les plans composites se prêtent bien au déroulement séquentiel d'une étude. En effet, ces plans nous donnent la possibilité de commencer l'étude avec un nombre minime d'expériences.

Ensuite, si le modèle est validé l'étude s'achève le plus souvent mais s'ils sont négatifs, on entreprend des essais supplémentaires pour établir un modèle du second degré.

2.3.2. Eléments d'un plan composite :

Les plans composites présentent trois parties :

- Le plan factoriel : c'est un plan factoriel complet ou fractionnaire à deux niveaux par facteurs. Les points expérimentaux sont aux sommets du domaine d'étude : carré, cube ou hypercube.
 - Le plan en étoile : les points de plan en étoile sont sur les axes qui représentent les facteurs et ils sont, en général, tous situés à la même distance du centre du domaine d'étude. Cette distance particulière est appelée alpha (α). Elle joue un rôle important pour la qualité du modèle et ne doit pas être choisie au hasard.
 - Les points au centre du domaine d'étude : on ajoute toujours des points expérimentaux situés au centre du domaine d'étude, et cela aussi bien pour les plans factoriel que pour les plans en étoile. Ces points servent, d'une part à contrôler qu'il n'y a pas de glissement entre le plan factoriel et le plan en étoile, d'autre part à obtenir une estimation de l'erreur expérimentale [22].
- Le nombre totale N d'essais à réaliser est la somme : des essais du plan factoriel, soit N_f , des essais du plan en étoile, soit N_α et des essais au centre, soit N_0 .

Le nombre totale N d'essais d'un plan composite est donné par la relation : $N = N_f + N_\alpha + N_0$

2.3.3. Modèle mathématique postulé :

Le modèle mathématique postulé utilisé pour les plans composites est un modèle du second degré dans lequel on conserve le coefficient constant, les termes du premier degré, les termes rectangles et les termes du second degré. Il n'y a pas d'interaction d'ordre 3 ou plus élevé [22].

Pour deux facteurs : $y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + e$

Pour trois facteurs :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + e$$

3. Analyses physico-chimiques et chromatographiques des HEs.

La qualité des HEs s'évalue par de nombreuses analyses physiques, chimiques ou sensorielles, qui ont été développées et mise en place par des commissions nationales et internationales d'experts de type ISO ou AFNOR [21].

3.1. Analyse organoleptique : la caractérisation organoleptique d'une HE se porte sur son aspect sa couleur et son odeur.

3.2. Analyses physiques : de nombreuses mesures physiques simples à réaliser servent à contrôler la qualité des huiles essentielles (densité, indice de réfraction, miscibilité à l'éthanol, pouvoir rotatoire...).

3.3. Analyses chimiques : La quantification des constituants des HEs pour évaluer leur qualité passe souvent par la mesure d'un indice obtenu à l'aide d'un titrage (indice d'acide, indice d'ester, indice d'iode, indice de peroxyde) [21].

3.4. Analyses chromatographiques :

• La chromatographie en phase gazeuse (GC) :

La chromatographie en phase gazeuse est un outil incontournable dans l'analyse des huiles essentielles. Son principe est basé sur la séparation de composés gazeux selon leurs affinités pour la phase stationnaire (colonne). L'analyse de composés solides ou liquides impose donc de pouvoir les passer à l'état gazeux par chauffage. C'est sans doute la principale contrainte de cette technique.

• D'autres techniques chromatographiques sont utilisées dans l'analyse des HEs tel que : la CCM, l'HPLC, et le couplage de la CPG à la spectrométrie de masse.

4. Analyse microbiologique :

L'analyse microbiologique consiste à étudier l'activité antimicrobienne des huiles essentielles par différentes méthodes.

4.1. Méthodes qualitatives telles que :

• **La méthode de l'aromatogramme :** c'est une méthode de diffusion en milieu gélosé (M-H), dont son principe est basé sur le pouvoir migratoire et inhibiteur de l'antibiotique ou d'une autre substance. Le résultat est exprimé par la mesure de diamètre d'inhibition où les bactéries n'ont pas pu se développer [24].

4.2. Méthodes quantitatives telles que :

• **La méthode des CMI :** C'est une technique de détermination des concentrations minimale inhibitrice par contact direct en milieu gélosé ou liquide. Elle consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié [12].

• **La méthode des CMB :** C'est une méthode qui a pour but de déterminer la concentration minimale en HE nécessaire à laquelle l'action bactéricide est totale [25].

Partie 2: Etude expérimentale

Chapitre 3: Matériel et méthodes

Chapitre 3- Matériel et méthodes

L'objectif visé dans cette partie, est l'obtention d'un meilleur rendement en huile essentielle de thym. Les conditions optimales sont déterminées, suite à une série d'extraction dont le nombre est obtenu grâce à l'application de la méthodologie des plans d'expériences.

Nous réalisons 09 expériences, en faisant varier le temps d'extraction et la forme de la matière première (broyée et non broyée), tout en maintenant le rapport masse/volume constant, durant tous les essais. L'introduction de la réponse, en l'occurrence le rendement, et les paramètres influençant le procédé d'extraction permet l'optimisation des conditions opératoires et l'obtention d'un point optimum correspondant au meilleur rendement.

La caractérisation de cette HE est faite par analyses physiques et chromatographiques. Nous nous sommes intéressées par la suite à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de thymus capitatus.

Au terme de cette partie de travail, la comparaison de certaines caractéristiques de thymus capitatus à celles de deux autres espèces de thym a été faite.

1. Matériel :

1.1. Matériel chimique (réactifs et solvants) : les produits utilisés ainsi que leurs caractéristiques sont regroupés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Produits chimiques utilisés.

Produit	Caractéristiques
Eau distillée, Eau physiologique stérile, Milieu gélosé	/
Ethanol à 96%	Liquide incolore, Masse molaire : 46,07 g/mol formule : C_2H_6O , masse volumique : 789 kg/m ³ point d'ébullition : 78,37 °C, point de fusion : -114,1 °C
Acide acétique anhydre	Liquide incolore, d'odeur nauséabonde, Point de fusion : -73 °C, Point d'éclair 49 °C, Densité de 1,08 gcm ³ à 20 °C
Acide sulfurique	Liquide Incolore, Inodore, entièrement miscible avec l'eau, densité à 20 °C: 1,84 g/cm ³ .
Acide nitrique	Liquide incolore d'odeur désagréable, point d'ébullition de 121°C, densité à 20°C: 1,39 g/cm ³ , pas ou peu miscible à l'eau.
Hydroxyde de sodium 25%	Liquide incolore, inodore, densité relative de 1,042.

1.2. Matériel de laboratoire : l'ensemble de matériel utilisé est regroupé dans le tableau 4.

Tableau 4 : Matériel de laboratoire utilisé durant le travail.

Equipements et dispositifs	Clevenger, balance analytique, chauffe ballon, hôte, étuve, thermomètre, bain marie, réfrigérateur.
Verreries	Béchers, cristallisoirs, verre de montre, fiole jaugée, seringue, éprouvette, ballon, pipette, micropipette, tubes en verre, boîtes de pétri, écouvillons, pipettes pasteur.
Appareille de mesure	Refractomètre d'Abbe, pied à coulisse.
Matériel d'analyse	Chromatographie en phase gazeuse de type Perkin Elmer (Clarus 580). Microscope optique à l'objectif 40.

1.3. Matériel biologique :

1.3.1. Matériel végétal :

1.3.1.1. Nomenclature et description botanique du genre thymus :

Les espèces du genre *Thymus* possèdent plusieurs nominations ; en Amazigh : Azukni, Tazuknite, en Arabe : Ziitra, Zaatar.

Le thym est un petit arbrisseau couramment appelé thym ou serpolet, forme de touffes compactes de 10 à 30 cm de hauteur. Ses tiges sont ramifiées, sessiles, petites et étroite de forme lancéolée, de couleur bleu vert. Les fleurs (roses pâles ou blanches) réunies en épis au sommet des branches. Le fruit est formé de quatre akènes marron et presque ronds [14].



Figure 2: *Thymus Capitatus*.

1.3.1.2. Récolte, séchage et identification du matériel végétal :

La plante (Figures 2) a été récoltée à la fin du mois d'avril à partir de la population végétale dans la région ouest de la Kabylie.

L'identification et la reconnaissance de la plante a été effectuée au niveau du Département de Biologie De La Faculté Des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

Elle a été nettoyée des débris, puis séchée dans l'étuve à 90°C pendant 1h30min.

1.3.1.3. Evaluation de taux d'humidité :

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau.

Chapitre 3- Matériel et méthodes

L'évaluation du taux d'humidité des plantes a été effectuée suivant la méthode décrite par Twidwell et ses collaborateurs, qui consiste à sécher une masse des feuilles de la plante à l'étuve à une température de 105 ± 5 °C pendant environ 2 heures [26]. Le calcul est effectué à l'aide de l'équation suivante :

$$(\%)H = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100$$

Avec :

m_1 : masse de l'échantillon avant séchage (en g).

m_2 : masse de l'échantillon après séchage (en g).

Pour plusieurs échantillons de feuilles, on calcule la moyenne arithmétique selon l'équation suivante :

$$\%H_{\text{moy}} = \frac{\%H_1 + \%H_2 + \%H_3 + \dots + \%H_n}{n}$$

Avec

H_i : Teneur en humidité de l'échantillon i (i variable de 1 à n).

$i = 1, 2, \dots, n$: nombre d'échantillons.

1.3.2. Matériel microbiologique :

1.3.2.1. Souches microbiennes testées :

Les souches sur lesquelles nous avons effectué les tests font parties des microorganismes pathogènes (trois bactéries et une levure), elles proviennent du laboratoire microbiologique de l'hôpital CHU de tizi-ouzou. Les caractéristiques de ces souches sont données dans le tableau 5.

Tableau 5 : Tableau représentant les souches testées.

Nom de la souche	Gram	Référence ATCC	Famille
Escherichia Coli	Négatif	25922	Enterobacteriaceae
staphylococcus aureus	Positif	25923	Micrococaceae
Pseudomonas aeruginosa	Négatif	27853	pseudomonaceae
Candida albicans	/	/	Saccharomycetaceae

1.3.2.2. Milieux utilisés pour le test :

Mueller-Hinton gélosé (M-H), Milieu Chapman, Milieu Hektoen, Gélose nutritif, le détail de la composition de ces milieux de culture utilisés est donné en annexe 3.

2. Méthodologie d'optimisation :

2.1. Construction du plan d'expérience :

Pour déterminer les conditions optimales du procédé d'extraction par hydrodistillation (clevenger), nous avons utilisé la MPE basée sur le plan composite au moyen du logiciel Modde, version 6.

2.1.1. Choix des facteurs et leur domaine de variation :

L'extraction des HEs est liée généralement, à l'appareil utilisé et au procédé suivi dans des conditions opératoires bien définis, à savoir la durée d'extraction et la forme de la plante.

Le choix des facteurs et leur domaine de variation (tableau 6) a été effectué selon les données de la littérature [4, 7, 24].

Tableau 6 : Domaine de variation des paramètres pour le plan composite.

Facteurs/niveaux	(-1)	0	(+1)
Temps d'extraction (min)	60	120	180
Forme de la matière végétale	Non broyée	broyée	broyée

La durée d'extraction est un facteur très important du moment que le rendement en huile essentielle augmente d'une façon proportionnel à la durée d'extraction, ce qui permet d'atteindre le but visé en obtenant un bon rendement.

La forme de la plante est choisie comme facteur dans le but de mettre en évidence l'influence de broyage et de situer la localisation des poches sécrétrices d'HE.

2.1.2. Choix de la réponse :

La réponse choisie est une réponse quantitative, le rendement de l'extraction d'huile essentielle

2.1.3. Construction du plan :

Dans notre étude nous avons deux facteurs l'un quantitatif (temps d'extraction) et l'autre qualitatif (forme de la matière végétale) $K=2$. Le nombre d'essais à réaliser est composé des essais du plan factoriel (N_F), auquel on ajoute trois points supplémentaires au centre du domaine (N_0) pour évaluer la reproductibilité de la réponse et l'erreur expérimentale, et des points « axiaux » pour le facteur quantitatif (N_α).

$$N = N_F + N_\alpha + N_0 \quad \Longrightarrow \quad N = 9 \text{ expériences}$$

L'équation qui régit le système est de la forme :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + e$$

Où : Y représente le rendement en huile essentielle.

X_1 et X_2 les variables réduites relatives au temps de l'extraction et la forme de la matière végétale.

a_{ij} : sont les coefficients du modèle. Avec $i = 0, 1, 2$ et $j = 1$

3. Expérimentation :

3.1. Méthode d'extraction :

L'extraction a été réalisée par hydrodistillation dans un appareil de type cleverger (figure 3), qui consiste à immerger directement le matériel végétal (20g), (entier ou éventuellement broyé) dans un ballon rempli avec une quantité d'eau distillée suffisante, pour recouvrir la matière végétale (266mL), qui est ensuite portée à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Lors de chauffage, l'HE va être entraînée avec la vapeur d'eau, ce mélange monte alors dans le cleverger et passent ensuite dans le réfrigérant qui est en permanence refroidi par une circulation d'eau. Au contact des parois froides les vapeurs sont refroidies et sont condensées dans l'ampoule à décanter. L'huile essentielle ainsi obtenue est mise dans des tubes en verre couverts en aluminium et conservée au réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'analyse.



Figure 3 : Montage de l'hydrodistillation de type Cleverger.

3.2. Détermination de rendement en huile essentielle :

Le rendement en huile essentielle est déterminé par l'équation suivante [6] :

$$R_{HE}(\%) = \frac{M_{HE}}{M_S} * 100$$

Avec : R_{HE} : est le rendement en huile essentielle (%),
 M_{HE} : est la masse de l'huile essentielle (g),
 M_S : est la masse de la matière végétale sèche

3.3. Caractérisation de l'HE :

La caractérisation de l'huile essentielle consiste à vérifier ses caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur, saveur), à déterminer les indices physiques (densité et indice de

réfraction) et à obtenir un profil chromatographique identifiant les différents constituants de l'huile essentielle [27].

3.3.1. Caractérisation organoleptique et physique :

✓ Caractéristiques organoleptiques :

Les caractères organoleptiques de l'HE sont déterminés par l'examen sensoriel de celle-ci.

✓ Densité relative à 20°C :

La densité relative est mesurée expérimentalement en utilisant une seringue de 1mL et calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad \text{Avec:}$$

m_0 : masse de la seringue vide (en g).
 m_1 : masse de la seringue remplie d'eau distillée (en g).
 m_2 : masse de la seringue remplie d'huile essentielle (en g).

✓ Indice de réfraction :

L'indice de réfraction est « le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux d'une longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile maintenue à une température constante » [21].

La mesure de l'indice de réfraction est effectuée au moyen du refractomètre d'Abbe (figure 4) et calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$n_D^T = n_D^{T'} + 0.0004 * (T' - T)$$

Où la température de référence est de 20 °C.

n_D^T : Indice de réfraction à 20 °C.

$n_D^{T'}$: Valeur de lecture.

✓ Miscibilité à l'éthanol :

La miscibilité à l'éthanol est déterminée en ajoutant un volume (V) d'alcool nécessaire pour former avec 0.2 ml d'huile essentielle, un mélange homogène [11, 28].

3.3.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse :

L'analyse a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse munie d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire, apolaire (Crossbond 100 % diméthylpolysiloxane) de 30 m de longueur, et 250µm de diamètre. La température du four a été réglée à 40 °C pendant 4 min puis à 280°C, à raison d'une montée de 10°C/min. Les températures

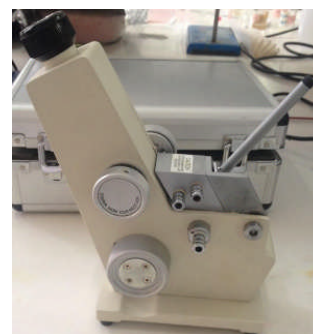


Figure 4 : Refractomètre d'Abbe.

de l'injecteur et du détecteur ont été fixées à 250°C et 280°C, respectivement. Le gaz vecteur est l'azote avec un débit de 1ml/min. Le volume de l'échantillon d'huile essentielle injecté est de 0.5µL.

L'appareil est piloté par un système informatique, gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

3.4. Identification chimique de thymol :

L'identification chimique de thymol a été effectuée en ajoutant à la solution aqueuse contenant le thymolate de sodium un volume de 1mL d'acide acétique anhydre, avec un volume de 0.15mL d'acide sulfurique, et un volume de 0.05 mL d'acide nitrique. Une coloration bleue-vert de la solution indique la présence de thymol.

La solution aqueuse de thymol a été préparée en mélangeant un volume de l'HE avec une quantité nécessaire de NaOH à 25% puis laisser réagir pendant 24 heures [5].

3.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de *thymus capitatus* :

3.5.1. Vérification de la pureté des bactéries et identification des souches :

Il est nécessaire d'identifier et de vérifier la pureté des souches avant la réalisation des tests d'évaluation de l'activité antimicrobienne. Cette opération a pour but la sélection des souches et la confirmation de leur nature, elle est fondée sur l'étude de leurs caractères bactériologique (morphologiques, culturels, biochimiques) et coloration (aspect des colonies, mobilité à l'état frais, coloration de Gram), ainsi que leurs caractéristiques biochimiques (test de catalase, test de la coagulase et le test de l'oxydase). Les différentes étapes à suivre sont :

-Repiquage des souches : consiste à réaliser des ré isollements des colonies bactériennes sur gélose nutritif puis sur des milieux sélectifs à l'aide d'une pipette pasteur, et les incuber dans une étuve.

• Examens d'orientation :

➤ **Examen macroscopique :** c'est l'appréciation des colonies bactériennes à l'œil nu pour déterminer la taille, la forme, la couleur et l'odeur....etc.

➤ **Examen microscopique :** l'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce microbienne, elle comprend l'examen à l'état frais et l'examen par coloration.

L'examen à l'état frais : c'est l'examen entre lame et lamelle des bactéries vivantes, il confirme la présence des bactéries et permet l'observation de leur forme, leur mode de regroupement et leur mobilité à l'aide d'un microscope optique à l'objectif 40.

L'examen par coloration de gram : permet non seulement d'observer la forme des cellules bactériennes mortes, mais également de classer les bactéries en deux groupes (les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif).

- **Identification des souches :**

- **La galerie biochimique :** ce test s'effectue par la galerie classique et la galerie API qui est un ensemble de petites cupules permettant l'identification de micro-organismes par la réalisation des tests biochimiques.

- **La réalisation de l'antibiogramme** afin d'étudier la résistance des souches aux antibiotiques et de vérifier que ce sont des souches ATCC.

(Pour le détail de la vérification de la pureté des souches microbiennes, voir annexe 3).

3.5.2. Méthode de diffusion sur milieu solide (aromatogramme) :

- **Choix de milieux de test :** le milieu choisi pour les souches bactériennes et la levure est la gélose Muller-Hinton. Le milieu MH a été coulé aseptiquement sur les boîtes de pétri sur une épaisseur de 4 mm (à raison 20 mL par boîte).

- **Préparation de l'inoculum :**

- **Inoculum bactérien :**

Les suspensions bactériennes ont été préparées par prélèvement de colonies bien isolées et parfaitement identiques à partir d'une culture pure de 18 à 24 heures à l'aide d'une anse de platine, cette dernière est déchargée au maximum dans 5 à 10 mL d'eau physiologique stérile à 0.9%. Les suspensions bactériennes sont homogénéisées puis ajustées à 0.5 Mc Farland qui correspond à une densité optique de 0.08 à 0.10 lue à 625 nm.

- **Inoculum fongique :**

La préparation de l'inoculum pour la levure est effectuée en utilisant la même procédure que pour les bactéries, sauf que la culture doit être âgée de 48 heures.

- **L'ensemencement :**

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne ou fongique en le pressant fermement contre la paroi interne de tube, afin de le décharger au maximum.

Chapitre 3- Matériel et méthodes

L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée séchée, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de pétri de 60° à chaque fois, en faisant pivoter l'écouvillon sur lui-même, et en le passant sur la périphérie de la gélose pour finir l'ensemencement.

- **Préparation des disques de l'aromatogramme :**

Les disques ont été préparés à partir de papier wattman N° 3 de diamètre de 6mm avec un contour bien régulier, ensuite ils sont mis dans un tube à essai, et stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120°C.

Les disques sont déposés à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen, sur la surface des géloses (MH) préalablement ensemencé par les suspensions microbiennes ou fongique, avec un espace d'au moins 20 mm centre à centre. Pour chaque boîte de pétri, on dépose au maximum 6 disques : deux disques imprégnés chacun de 5µL l'HE, l'un de celle de thymus capitatus et l'autre de l'HE de référence (HE de thymus zygis) à l'aide d'une micropipette.

Un disque imprégné de 5µL de l'eau physiologique stérile comme témoin négatif pour toutes les souches en utilisant une micropipette de 5µL.

Un disque imprégné de 5µL de l'antibiotique comme témoin positif. (La Fox pour E. coli et la Rif pour le staphylocoque aureus).

- **Incubation et lecture :**

Les boîtes de pétries sont ensuite fermées et incubées à 37°C pendant 24 heures et 48h respectivement pour les bactéries et les levures.

La lecture est faite pour chaque HE par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition de la prolifération microbienne (figure 5) à l'aide d'un pied à coulisse. Les diamètres ainsi mesurés sont comparés à des diagrammes de référence.

Le calcul du pourcentage d'inhibition est fait suivant cette loi :

$$\%d'inhibition = \frac{D_{(test)}}{D_{(boite\ de\ pétri)}} * 100$$

Avec : D (test) : Diamètre de la zone d'inhibition.

D (boîtes de pétri) : Diamètre de la boîte de pétrie.

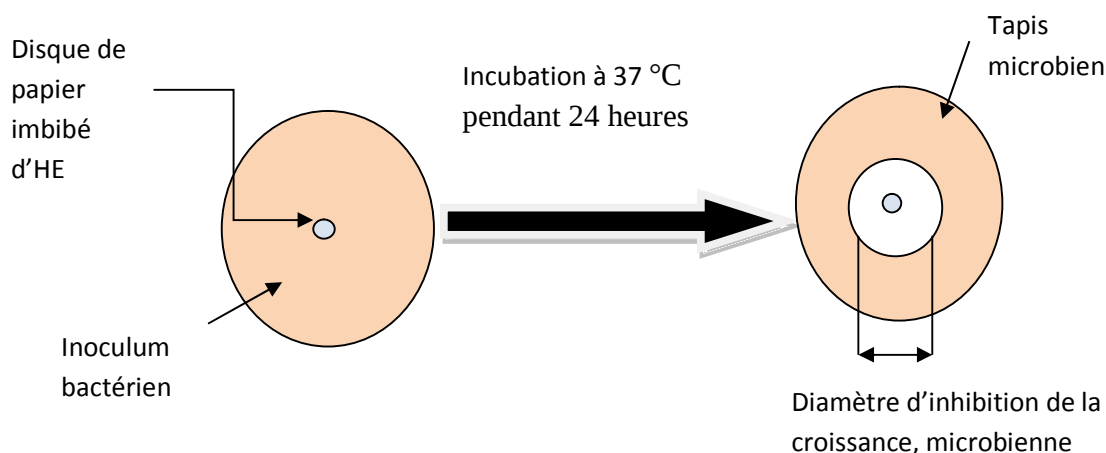


Figure 5 : Principe de la méthode de diffusion par disque.

Les souches testées peuvent être classées selon leur sensibilité vis-à-vis de l'HE de *thymus capitatus*.

3.5.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice :

L'évaluation quantitative de pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *thymus capitatus* correspond à la détermination de la concentration minimale inhibitrice sur des microorganismes par la méthode des dilutions en milieu solide.

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus faible concentration d'un antibiotique ou d'une autre substance capable d'inhiber dans un milieu (soit milieu liquide soit milieu solide), toute croissance visible à l'œil nu après 24 heures d'incubation à 37°C. En d'autres termes c'est la concentration minimale d'huile essentielle qui produit une réduction de plus de 90% de la croissance des colonies microbiennes, donc ne laisse survivre que 10% de la population [11].

L'évaluation de la CMI se pratique en milieu solide ou en milieu liquide. La méthode utilisée est celle de dilution en milieu solide.

• Préparation des pré-cultures et de l'inoculum :

La procédure suivie pour la préparation des suspensions bactériennes et fongiques est la même que celle décrite précédemment dans la méthode des aromatoigrammes.

- **Préparation des dilutions d'huile essentielle :**

Quatre boîtes de pétri ont été préparées en prélevant des volumes différents d'huile essentielle de thym qui sont ensuite ajustés à 20 mL par la gélose M-H, tout en agitant pendant quelques secondes pour homogénéiser le milieu M-H avec l'HE, puis laisser refroidir et solidifier. Le tableau 7 présente les concentrations utilisées pour la réalisation de ce test.

Tableau 7: Concentrations utilisées pour la réalisation de test de la CMI.

Dilution (%)	5%	2.5%	1.25%	0.625%
Volume de l'HE (mL)	1mL	0.5mL	0.25mL	0.125mL

- **Dépôt des spots :**

Après solidification, des spots de 2 μ L des souches microbiennes de densité de 0.5 McFarland sont déposés à la surface de la gélose.

- **Incubation et lecture :**

Les boîtes de pétri (contenant témoins et essais) sont incubées à 37°C pendant 24 et 48 heures respectivement pour les bactéries et les levures.

La lecture de la CMI se fait en cherchant l'apparition des colonies, la CMI correspond visuellement à la concentration de l'HE en absence de croissance microbienne.

3.5.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB :

La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique laissant après 18 à 24 heures d'incubation un pourcentage de survivants inférieur à 0.01% (soit -4 Log10) de l'inoculum de départ. Autrement dit la CMB décrit l'effet bactéricide d'une substance, elle correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99.9% de l'inoculum bactérien initial [29].

La détermination de la CMB d'une HE est réalisée en faisant un repiquage des zones d'inhibition formées par les CMI et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur le milieu de culture (gélose M-H) puis incubé pendant 24 heures.

3.6. Etude comparative :

Nous avons effectué une comparaison entre certaines caractéristiques de trois huiles essentielles de trois espèces de plantes différentes (T.capitatus, T.vulgaris, T.zygis).

3.6.1. Comparaison avec l'HE de thymus vulgaris :

- **Présentation :**

Thymus vulgaris est une plante typique des garrigues, qui s'accommode particulièrement des zones calcaires et rocailleuses, ne dépassant pas 2500 m d'altitude. Elle préfère les sols légers, perméables, secs ou bien drainés, légèrement alcalins, constamment ensoleillés et quelque peu riches en matières organiques et en éléments minéraux fertilisants.

- **Séchage et extraction :**

Le thymus vulgaris cultivé a été récolté le mois de mai dans la région de Kabylie. L'identification et la reconnaissance de la plante a été effectuée au niveau du Département de Biologie De La Faculté Des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

La plante a été nettoyée des débris, puis séchée dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires et de l'humidité pendant au moins 10 jours.

L'extraction a été réalisée par hydrodistillation dans un appareil de type cleverger en utilisant les conditions d'extraction optimales obtenus après l'optimisation de l'extraction de l'HE de thymus capitatus.

Les conditions optimales sont : -Temps d'extraction 60min.

- Forme non broyée de la plante.

La comparaison entre les deux huiles concerne le rendement, l'analyse organoleptique et la mesure de l'indice de réfraction.

3.6.2. Comparaison avec l'HE de thymus zygis :

Cette comparaison concerne, les caractéristiques organoleptiques et physiques, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse et l'évaluation de l'activité bactérienne par la méthode d'aromatogramme.

Chapitre 4: Résultats et discussions

1. Etude statistique des résultats d'extraction:

Cette étape consiste à étudier et à exploiter les résultats obtenus par la méthodologie des plans d'expériences (tableau 8).

Tableau 8 : Résultats de plan d'expériences.

Nombre d'expériences	Temps d'extraction		Forme de la plante		Rendement (%)
	Valeur codée (X ₁)	Valeur réelle (min)	Valeur codée (X ₂)	Valeur réelle (min)	
1	-1	60	-1	Non broyée	1.61
2	1	180	-1	Non broyée	1.70
3	0	120	-1	Non broyée	1.43
4	-1	60	1	broyée	1.2
5	1	180	1	broyée	1.23
6	0	120	1	broyée	1.1
7	0	120	1	broyée	1.05
8	0	120	1	broyée	0.95
9	0	120	1	broyée	0.9

1.1. Validation du modèle mathématique:

Un modèle est la représentation plus ou moins approchée d'un processus. Il est dit mathématique, lorsque le processus est soumis à un ensemble d'équations mathématiques.

Une fois établi le modèle peut rendre compte du comportement du système. Il permet de faire des prévisions, de formuler des recommandations et il ouvre donc la voie aux problèmes de l'optimisation [30].

L'estimation de modèle mathématique est souvent gérée par un outil informatique, qui est le logiciel MODDE dans notre cas. Ce logiciel facilite la construction du plan d'expériences et les calculs nécessaires à son interprétation. Il favorise également les représentations graphiques qui illustrent de manière explicite les résultats, et améliore la compréhension des phénomènes.

Avant d'optimiser les résultats obtenus durant les manipulations, il faut d'abord valider le modèle mathématique utilisé. La validité de modèle dans le domaine étudié consiste à vérifier son adéquation par la détermination des coefficients de modèle (R^2) et (Q^2), puis à déterminer les facteurs significatifs et non significatifs et à étudier les interactions. À partir de là, le modèle est

établi, l'étape finale pour vérifier et confirmer la validité du modèle, est l'analyse de la variance et l'étude des résidus.

1.1.1. Adéquation du modèle:

Comme cela a été dit précédemment, cela consiste à vérifier le degré d'approximation des résultats expérimentaux et ceux du modèle par le coefficient de détermination multiple R^2 et Q^2 qui présentent la capacité du modèle de prédire la réponse. Pour avoir un bon ajustement, R^2 et Q^2 doivent être proche de l'unité (la limite inférieure de R^2 est 0.8 et celle de Q^2 est 0.5).

Une barre de validité du modèle égale à l'unité représente un modèle parfait [31].

La figure 6 montre la dispersion de la réponse observée en fonction de la réponse prédite. Elle représente l'évaluation du modèle. Tous les points se rapprochent de la diagonale, ce qui permet de conclure que les valeurs expérimentales sont proches des valeurs prédites.

Les valeurs des coefficients R^2 et Q^2 sont 0.961 et 0.933 respectivement. Ces valeurs sont proches de l'unité, elles sont acceptables le modèle est par conséquent adéquat.

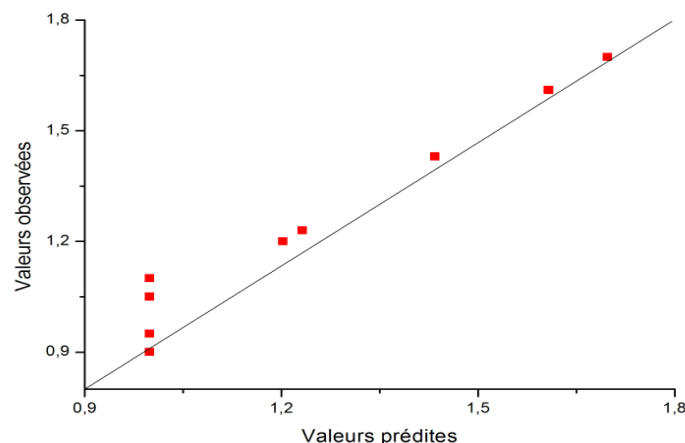


Figure 6 : Dispersion de la réponse observée en fonction de la réponse prédite.

1.1.2. Facteurs significatifs :

Un facteur est significatif, lorsque son intervalle de confiance, matérialisé par la barre verticale (figure 7), ne coupe pas l'axe horizontal.

Les facteurs influents sur le rendement de l'extraction sont la forme de la plante en terme linéaire, et la durée d'extraction en terme quadratique.

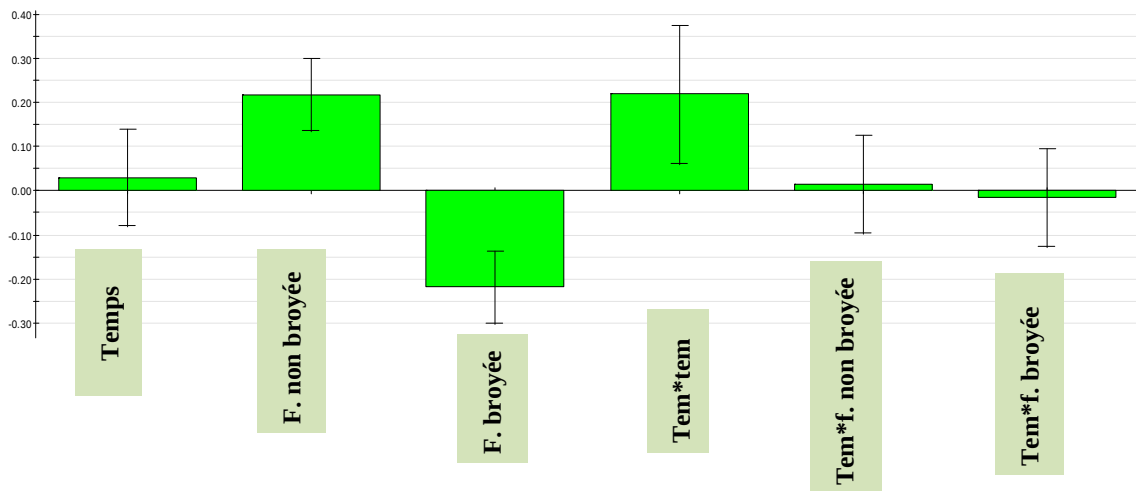


Figure 7 : Histogramme de l'influence des coefficients sur le rendement en HE.

Les facteurs influents sur le rendement de l'extraction sont la forme de la plante en terme linéaire et la durée d'extraction en terme quadratique.

Le facteur forme non broyée influe positivement sur le rendement alors que le facteur forme broyée influe négativement, ceci est probablement expliqué par la localisation des poches sécrétrices de l'huile essentielle qui se trouve à la surface. Ce résultat est confirmé par l'étude histologique réalisée par certains auteurs sur la plante de thym et interprétée du faite que la membrane externe ou la cuticule qui constitue la seule barrière à la libération de l'HE, est vite rompue à ébullition [5]. Ou de faite que durant le broyage une partie de ces huiles s'est dégradée suite à la destruction de ces poches sécrétrices.

Ce résultat est également comparable à celui de l'étude de Latreche et Rebouh (2008) sur l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle de thymus pallescens entière ou broyée, le rendement maximal est obtenu dans cette étude pour la plante entière (3,46%) alors que pour la plante broyée un rendement de 2,99 % a été obtenu.

Ils ont expliqué cette observation par le faite que durant le broyage, une partie des huiles essentielles s'est volatilisée, puisque ces dernières sont des substances très volatiles, et ont déduit que le broyage est inutile puisque les sites de stockage des huiles essentielles se trouvent à la surface [27].

1.1.3. Analyse de la variance :

L'analyse de la variance (**ANOVA**) permet de comparer les variances des valeurs calculées par le modèle et les résidus, et constitue un test statistique (**test de Fisher**).

Chapitre 4-Résultats et discussions

L'analyse de la variance (tableau 9) permet de confirmer ou non si les variables retenues pour la modélisation ont, dans leur ensemble, un effet significatif sur la réponse. Les modèles avec des valeurs de p-value proches de zéro sont statistiquement significatifs et considérés comme appropriés pour décrire la réponse étudiée correspondante. Et si le F de Fisher expérimental (Fobs) est supérieur à F de Fisher tabulé (Fcrit), le modèle est jugé valide.

Le test de Fisher permet de vérifier, si l'équation établie bien une relation entre la variation des facteurs et de la réponse, ou si c'est dû à un changement, une fluctuation aléatoire de la réponse dans le domaine expérimental [32].

D'après l'analyse ANOVA, le modèle est validé, de fait que $p\text{-value} = 0.004 < 0.005$ et Fobs est supérieur à Fcrit.

Au seuil de signification $\alpha = 0,05$, $F_{\text{crit}} = F(\text{regression/residuel}) = F(4,4) = 6.388$ (voir tableau 1 dans annexe 1).

Tableau 9 : Analyse de la variance.

	Somme des carrées	DDL	Carrée moyen	Fobs	Fcrit	p-value
Régression	0.616644	4	0.154161	24.622	6.388	0.004
Résidus	0.0250445	4	0.00626112			
Totale	0.641688	8	0.080211			

1.1.4. Etude des résidus :

Pour compléter l'analyse statistique du modèle. Il faut s'assurer que les résidus ne soient pas anormalement importants. Cette étude s'effectue par l'observation de l'évolution des résidus estimés en fonction des réponses prévues par le modèle.

La description de la dispersion des points (réponses) permet la vérification de la validité du modèle. Si les points sont distribués d'une façon aléatoire, le modèle est validé. En revanche, si la distribution des points prend une forme remarquable ou bien définie (par exemple sinusoïdale, droite...) cela signifie que la variation de la réponse est due aux résidus [31].

La figure 8 donne l'évolution des résidus en fonction des facteurs étudiés. Elle montre que la dispersion de ces résidus est aléatoire.

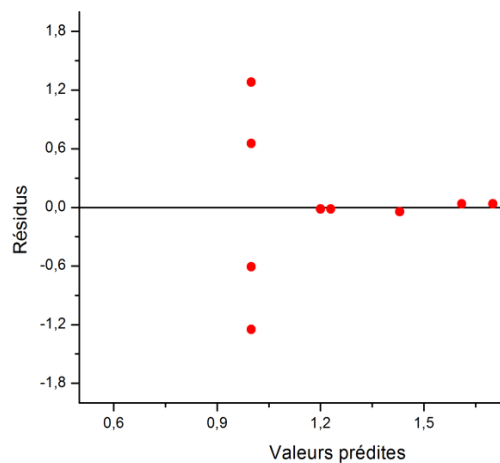


Figure 8 : Evolution des résidus en fonction des réponses prédites.

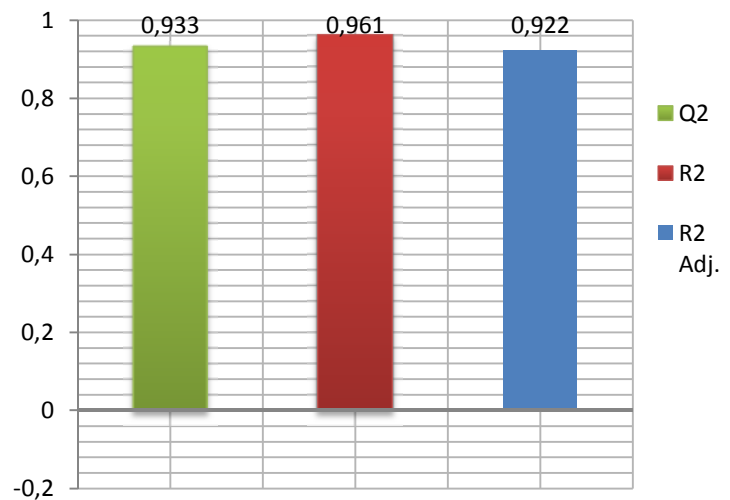


Figure 9 : Valeurs de Q^2 et R^2 en fonction de la réponse.

1.2. Modélisation de la réponse :

Les valeurs des coefficients R^2 et Q^2 sont représentées dans la figure 9.

Au seuil de significativité de 5 %, l'analyse statistique des résultats montre que le rendement peut être décrit par le modèle selon l'équation (1) en éliminant les facteurs non significatifs :

$$\text{Rendement} = 0.217778 \cdot \text{forme non broyée} - 0.217778 \cdot \text{forme broyée} + 0.218333 \cdot \text{tem}^2 \quad (1)$$

D'après cette équation, nous pouvons dire que le rendement est en fonction de la forme non broyée et broyée en termes linaires et en fonction de temps en termes quadratiques.

1.3. Phase d'optimisation :

Afin de trouver la solution optimale, nous avons utilisé le module « optimiser » du logiciel MODDE 6.

Les caractéristiques de la réponse optimale sont montrées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 10 : Caractéristiques de la réponse optimale.

Réponse	Critère	Min	Target	Max
Rendement	Maximiser	1.764	1.906	

Le module d'optimisation fournit un ensemble de solutions possibles et indique la solution la plus proche de l'optimum. Le logiciel propose deux solutions optimales présentées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Ensemble des solutions donnés par le module « optimizer »

Solutions	Temps d'extraction	Forme de la plante	rendement
1	-1	Non broyée	1.6078
2	1	Non broyée	1.6978

Notre objectif est d'avoir un meilleur rendement en un minimum de temps, alors nous avons choisi la solution 1 qui donne un rendement de 1.6078 avec la forme non broyée de la plante pour une durée d'extraction d'une heure.

Pour confirmer l'efficacité de l'optimisation, une extraction a été réalisée dans les conditions optimales données par le logiciel c'est-à-dire l'extraction de la plante non broyée durant une heure. Le rendement obtenu est de 1.68%, cette valeur est proche de la valeur prédite par le logiciel (1.6078%).

2. Calcul du taux d'humidité :

Le taux d'humidité de nos échantillons de thymus capitatus est un taux moyen de 68%, ce qui signifie que 32% représente le taux de matière sèche ayant servi à l'extraction de l'huile essentielle (figure10).

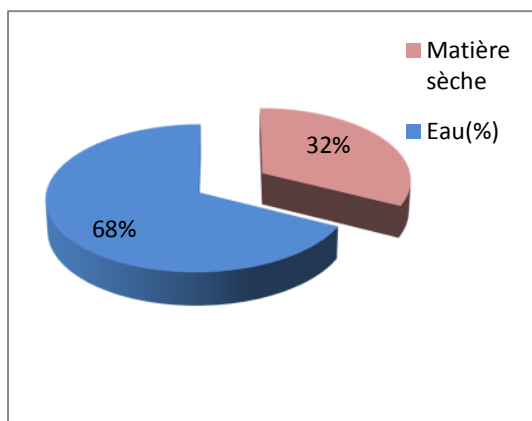


Figure 10 : Taux d'humidité de thymus capitatus

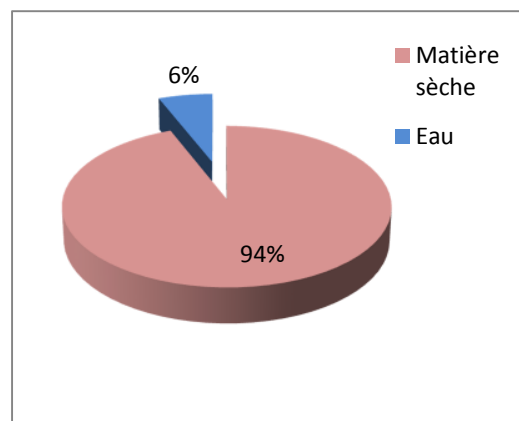


Figure 11 : Teneur en eau des feuilles sèches de thymus capitatus.

Afin de vérifier la conformité de séchage, nous avons suivi la même méthode (celle de Twidwell) sur des échantillons de la plante préalablement séchée. Les résultats sont présentés dans la figure11.

Un taux d'humidité inférieur à 10% assure une bonne conservation de la plante sèche [33].

La valeur moyenne de taux d'humidité obtenu correspond à la norme ($< 10\%$), ce qui permet de préserver la qualité de la plante en cas de stockage.

3. Evolution du rendement de l'extraction:

Nous avons suivi, par observation, l'évolution du rendement de l'huile essentielle de thym, au cours de l'hydrodistillation Clevenger, nous avons noté trois phases bien distinctes: la première qui correspond au chauffage de la matière première durant laquelle le rendement est nul, la seconde est relative au début de l'extraction, avec l'apparition des premières gouttes d'huile, le rendement augmente d'une manière significative au bout de 30 minutes, la dernière étape correspond au ralentissement de l'augmentation du rendement, elle présente le rendement maximum possible à atteindre.

4. Caractérisation de l'huile essentielle de thym :

4.1. Caractérisation physique et organoleptique :

La caractérisation physique et organoleptique de l'huile essentielle fait partie de la démarche de contrôle qualité. La densité d'une HE constitue un critère indispensable pour l'évaluation de sa qualité, elle nous renseigne sur les tentatives de fraudes et l'adultération [34]. La valeur de l'indice de réfraction constitue également un critère très important car elle nous renseigne sur la teneur en mono terpènes. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, et une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse [3].

Les caractéristiques physiques et organoleptiques de notre huile essentielle et de quelques espèces de thym selon la littérature et les normes sont résumées dans le tableau 12.

D'après ces résultats (tableau 12) l'HE de thymus capitatus est un liquide mobile qui possède une couleur jaune pâle et une odeur très caractéristique. Ces résultats sont conformes à ceux cités dans la littérature [5, 27].

Les caractéristiques physiques obtenues montrent que la valeur de la densité relative de l'HE de thymus capitatus est légèrement différente de celles données par la pharmacopée et les normes AFNOR. Par contre la valeur obtenue pour l'indice de réfraction est conforme à la norme AFNOR. Concernant la miscibilité à l'éthanol, le résultat obtenu pour notre plante est identique à celui obtenu sur le thymus pulegioides réalisé par M.B. Belkheir (2011) [27].

Tableau 12 : Caractéristiques physiques et organoleptiques de l'HE extraite, de thymus capitatus et de quelques espèces de thym selon la littérature et les normes.

/	Espèce	Aspect	Couleur	Odeur	Indice de réfraction	Densité relative à 20°C	Miscibilité à l'éthanol
/	T. capitatus	Liquide mobile	Jaune pâle	Forte caractéristique et piquante.	1.4854	0.8384	1V/1V
Données de littérature	T. Numidicus [5]	liquide mobile	Jaune brun	Agréable, aromatique avec un fond épicé.	1.5000	0.8732	/
	T. Numidicus [27]	/	jaune pâle	/	1.496	0.853	/
	T. Pallescence [27]	Liquide mobile	Jaune foncé	Epicée, piquante	1.491	0.935	1V/1V
Normes AFNOR [34]	Thymus	/	/	/	1,4830 à 1,5100	0,894 à 0,930	/
Pharmacopée Européenne [35]	Thymus	liquide mobile, limpide	Jaune à brun-rouge très foncé.	Odeur caractéristique, aromatique épicée, rappelant celle du thymol	1.490 à 1.505	0.915 à 0.935	/

4.2. Analyse chromatographique:

L'analyse par CPG de l'huile essentielle de thymus capitatus a fourni 16 pics correspondant à 16 composés volatils avec des pourcentages différents (annexe 2). Le pourcentage enregistré le plus élevé est de 82.96%, il correspond au composé C10 avec un temps de rétention de 11.926 min.

5. Résultats de l'identification chimique de thymol :

En effectuant le test d'identification du thymol, nous avons constaté que la couleur de la solution aqueuse de l'huile essentielle de thym a viré à la couleur orange (figure 12) au lieu de la couleur bleu vert. Cela est dû probablement à l'absence de thymol dans la composition chimique de notre huile essentielle.

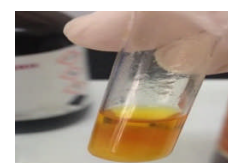


Figure12 : Test d'identification chimique de thymol.

6. Résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne :

6.1. Identification des souches :

• **Résultats de repiquage** : En visualisant les boîtes de pétri sur lesquelles nous avons réalisé les repiquages, nous observons que les trois souches poussent sur GN. Cela signifie que ce sont des bactéries non exigeantes.

Escherichia coli et pseudomonas poussent sur hektoen et ne poussent pas sur chapman, ce qui indique que ce sont des BGN. Par contre le staphylococcus aureus pousse sur chapman, et ne poussent pas sur hektoen de faite qu'il fait partie des Staphylycoccacea.

Les résultats des autres tests sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 13 : Résultats de l'identification des souches.

Tests réalisés		Souches bactériennes		
		E. coli	P. aeuroginosa.	S.aureus
Aspect macroscopique		Colonies régulières et rondes, plates avec un centre ombiliqué.	Colonies plus au moins larges, vertes, irrégulières, centre bombé. Dégage une odeur aromatique	Colonies petites, plus ou moins bombées, régulières et dorées.
Aspect microscopique	Coloration de Gram	Coccobacille à Gram (-)	Bacille large à Gram (-)	Cocci à Gram (+) agencement en grappe de raisin
	Etat frais	Mobile au tour d'elle même	Très mobile	immobile
Catalase		+	+	+
Oxydase		-	+	-
Coagulase		/	/	+
Galerie classique	fermentation des sucres TSI	Glu + Sac + Lac +	Glu – Sac – Lac -	/
	Citrate de Simmons	Citrate -	Citrate ±	
Galerie API 20 E	Indole	+	/	/
	LDC	+		
	ODC	+		
	VP (voie d'attaque des glucides)	-		
	ONPG	+		
	TDA	+		

Chapitre 4-Résultats et discussions

En rassemblant tous ces arguments obtenus par les différents tests de l'identification, nous pouvons confirmer que les souches avec lesquelles nous travaillons sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

6.2. Résultats de l'aromatogramme :

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire et inhibiteur de l'HE à partir de disque sur le milieu gélosé. L'évaluation de pouvoir antimicrobien a été mise en évidence en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de la prolifération microbienne pour l'HE vis-à-vis les souches testées.

Les valeurs de diamètre des zones d'inhibition de l'HE et de l'antibiotique (témoin positif) après incubation à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 48h pour la levure, sont représentés dans le tableau 14.

Les résultats exprimés par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition sont traduits selon la méthode de Meena et Sethi (1994) et Ela et ces collaborateurs (1996) [3]:

- **FI**, Fortement inhibitrice : diamètre > 28mm
- **MI**, Modérément inhibitrice : 16 < diamètre < 28mm
- **LI**, Légèrement inhibitrice : 10 < diameter < 16mm
- **NI**, Non inhibitrice : diamètre < 10mm.

Une évaluation de l'activité antimicrobienne de thymol commercial par la méthode des aromagrammes a été réalisée par nos camarades dans le cadre de travail intitulé « Optimisation de la composition d'une forme pharmaceutique ». Les résultats sont représentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition des HE et de thymol commercial vis-à-vis des souches testées.

Souches testées	Diamètre moyen (mm)			Pourcentage d'inhibition(%)			Catégorie d'inhibition		
	HEe	TC	Tp	HEe	TC	Tp	HEe	TC	Tp
Staphylococcus aureus (G+)	16	9	26	18.8%	10.58%	30.58%	MI	NI	MI
Escherichia coli (G-)	48	9	28	56.47%	10.58%	32.94%	FI	NI	FI
Pseudomonas aeruginosa (G-)	25	20	20	29.41%	23.52%	23.53%	MI	MI	MI
Candida albicans (levure)	40	/	/	47.05%	/	/	FI	/	/

HEe : huile essentielle extraite de thymus capitatus ; **TC** : thymol commercial **Tp** : témoin positif.

Selon l'échelle de classement :

L'HE extraite de thymus capitatus présente une forte action inhibitrice sur la bactérie *Escherichia coli*, et sur la levure *Candida albicans* et une action modérément inhibitrice sur les bactéries *Staphylococcus aureus* (G+), et *Pseudomonas aeruginosa* (G-). Autrement dit les bactéries *Staphylococcus aureus* (G+) et *Pseudomonas aeruginosa* (G-) sont plus résistantes que la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Candida albicans*.

Le thymol commercial contrairement aux HEs, possède uniquement une action modérément inhibitrice sur *Pseudomonas aeruginosa* (G-), et il n'a pas d'action sur les autres souches et la levure.

La figure suivante montre l'histogramme des diamètres d'inhibition, de la prolifération microbienne de chaque produits en fonction des souches testées.

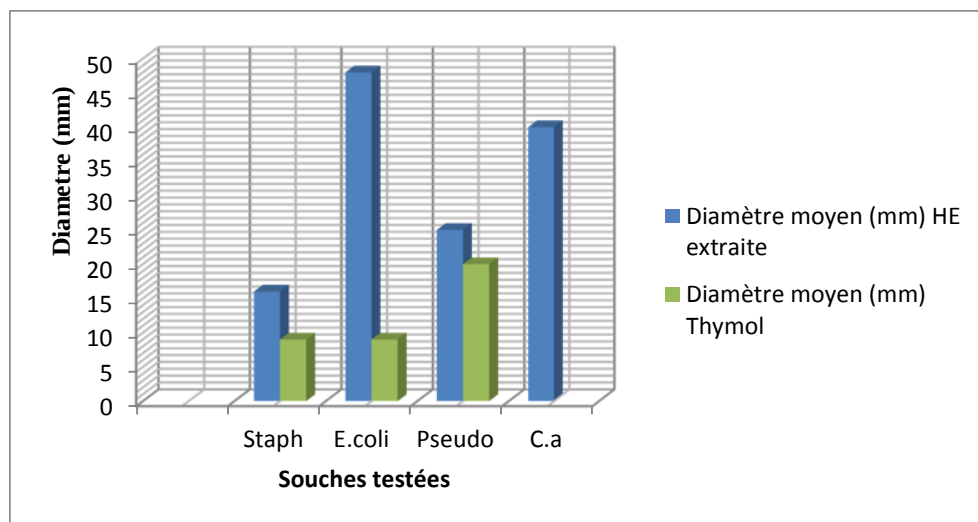


Figure 14 : Histogramme des diamètres d'inhibition de chaque produit en fonction des souches testées.

Les informations obtenues relatives à l'étude qualitative de l'activité antimicrobienne sont très intéressantes. En effet l'huile essentielle de thymus capitatus présente une activité antibactérienne et antifongique importante. Ce résultat étant positif, il pourra être exploité dans la fabrication des produits à usage thérapeutique.

6.3. Résultats de la méthode des CMI et CMB:

L'évaluation de la CMI a été réalisée uniquement pour l'HE extraite de thymus capitatus. Le tableau suivant présente les résultats obtenus.

Tableau 15 : Résultats de la CMI pour l'HE de thymus capitatus.

	1ml	0.5ml	0.25ml	0.125ml
Staphylococcus aureus (G+)	+	+	+	+
Escherichia coli (G-)	-	-	+	+
Pseudomonas aeruginosa (G-)	+	+	+	+
Candida albicans (levure)	+	+	+	+

(-) : Inhibition ; (+) : Croissance.

La détermination de la CMB de l'huiles essentielles de T. capitatus a été effectuée seulement sur les germes ayant présenté une sensibilité par le test des CMI à savoir Escherichia coli.

D'après les résultats de la CMB, l'HE de thymus capitatus a une action bactéricide seulement sur la bactérie Escherichia. Coli avec une CMB égale à 419.2µg/mL (correspond à 0.5mL d'HE).

En général, les bactéries gram positifs sont plus sensibles à l'action des HE que les bactéries gram négatif mais dans notre cas nous avons trouvé que la souche la plus sensible est Escherichia coli (gram -) avec une CMI et une CMB de 419.2 µg/mL et la souche la plus résistante est staphylococcus aureus (gram +) avec une CMI > 1ml/20ml.

Nos résultats sont semblables à ceux de zaghib et al (2010), qui ont montré une sensibilité plus importante des bactéries gram (-) comparé aux bactéries gram (+) vis-à-vis l'huile essentielle de thymus hirtus. Ainsi qu'à ceux de Farah Haddouchi et al, qui ont indiqué que l'HE de thymus fontanesii constitue une exception de fait qu'elle est bactéricide contre les bactéries gram (-) et bactériostatiques contre les bactéries gram (+).

Cette sensibilité supérieures vis-à-vis des bactéries gram(-) par rapport aux bactéries gram (+) peut être expliquée par la relation structure- activité [36, 37].

• Relation structure-activité :

Certains composés phénoliques de bas poids moléculaires comme le thymol et le carvacrol présents dans l'huile essentielle, peuvent grâce à leurs groupes fonctionnels adhérer aux bactéries gram négatif, par fixation aux protéines et aux lipophylsaccharides membranaires et rendre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable [23].

Cet écart de valeur de CMI de l'HE de thymus capitatus par rapport aux autres espèces de thym peut être attribué à la différence de la composition chimique et à la nature de chémotype.

7. Résultats de l'étude comparative :

- **Comparaison des rendements et de certaines caractéristiques de l'HE de T.capitatus, T.vulgaris, T.zygis:**

Les résultats sont regroupés dans le tableau 16.

Tableau 16: Comparaison entre les trois espèces de thym (T.capitatus, T.vulgaris, T.zygis).

		T. capitatus	T. vulgaris	T. zygis
Rendement d'extraction		1.6	1.12	/
Caractéristiques organoleptiques	Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile	Liquide mobile
	Couleur	Jaune pale	Jaune foncée	Jaune brun
	Odeur	Odeur forte caractéristique et piquante	Odeur agréable, aromatique.	Odeur très forte caractéristique, aromatique
	Densité relative	0.8384	/	0.903
Analyse physique	Indice de réfraction	1.4854	1.5044	1.5104

D'après ce tableau on constate une différence des caractéristiques organoleptiques et physiques entre les trois espèces. Par ailleurs, une différence de rendement d'extraction en HE, en utilisant les mêmes conditions opératoires, entre les espèces capitatus et vulgaris est à indiquer. Cette différence est attribuée en premier lieu à la différence de l'espèce, puis à la provenance, la période de récoltes, la durée et le type de séchage...etc.

- **Comparaison de profil chromatographique entre le T. capitatus et le T. zygis :**

Afin de pouvoir comparer entre la composition de l'HE extraite de thymus capitatus, et l'HE commerciale de thymus zygis, nous avons superposé leurs deux chromatogrammes obtenus dans les mêmes conditions opératoires (voir figure 15).

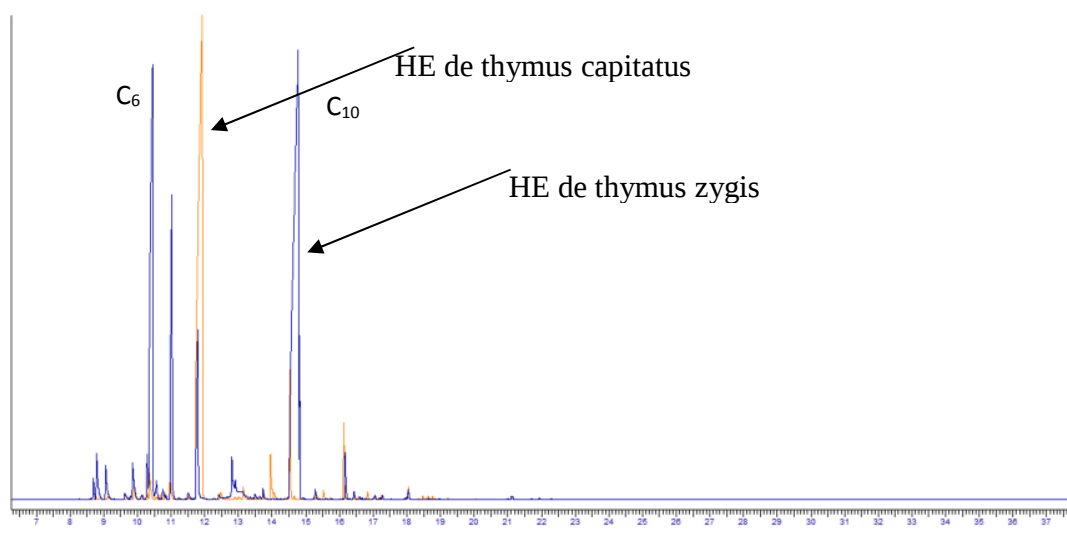


Figure 15 : Superposition des deux chromatogrammes de l'HE de T. capitatus et le T. zygis

Les composées majoritaires de l'HE commerciale de thymus zygis, sont le thymol et p-cymène. (D'après la notice accompagnant le flacon de cette l'HE)

Le chromatogramme obtenu pour cette huile montre la présence de deux composés majoritaires le C₁₀ à 47.98% et le C₆ à 24.01%, en comparaison avec les données de la notice, il s'agit du thymol et du p-cymène respectivement. Nous déduisons, par conséquence, que le composé majoritaire de l'HE extraite de thymus capitatus n'est pas de thymol, ce qui est en accord avec le test d'identification de thymol réalisé.

• Comparaison de l'activité antimicrobienne entre l'HE de T.capitatus et T. zygis :

Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 17 : Comparaison de l'activité antimicrobienne entre l'HE de T.capitatus et T. zygis

Souches testées	Diamètre moyen (mm)		Pourcentage d'inhibition(%)		Catégorie d'inhibition	
	HEe	HEr	HEe	HEr	HEe	HEr
Staphylococcus aureus (G+)	16	60	18.8%	70.58%	MI	FI
Escherichia coli (G-)	48	50	56.47%	58.82%	FI	FI
Pseudomonas aeruginosa (G-)	25	34	29.41%	40%	MI	FI
Candida albicans (levure)	40	60	47.05%	70.58%	FI	FI

Chapitre 4-Résultats et discussions

HEe : huile essentielle extraite de thymus capitatus ; **HEr** : huile essentielle de référence (HE commerciale de thymus zygis).

L'HE de référence présente une forte action inhibitrice sur les trois bactéries, ainsi que sur la levure. La différence d'activité entre les deux huiles essentielles vis-à-vis des souches testées, est probablement liée à plusieurs facteurs tels que : la composition chimique de l'huile, la saison de cueillette, la provenance de l'espèce, les conditions climatiques...etc.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le genre thymus fait partie des plantes aromatiques ; il est riche en huiles essentielles qui lui confèrent une grande variété biologique. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à extraire l'huile essentielle de thymus capitatus, en vue de l'optimisation du rendement d'extraction, de la caractérisation et l'évaluation de l'activité antimicrobienne de celle-ci.

L'optimisation du procédé d'extraction en utilisant la méthodologie de surface de réponse par le plan composite a permis d'obtenir le modèle mathématique décrivant la variation du rendement en fonction des deux paramètres choisis (durée d'extraction et forme de la plante), et par conséquent, d'avoir les conditions optimales permettant d'atteindre le meilleur rendement. L'analyse du modèle mathématique montre qu'il est bien validé et ajusté. La modélisation de la réponse par le logiciel MODDE constate que le rendement optimum enregistré qui est de 1.6%, est obtenu en une heure de temps pour la forme non broyée.

Cette optimisation a prouvé l'efficacité des plans d'expériences à fournir le meilleur protocole expérimental avec l'économie de temps et de coût tout en provenant à un résultat fiable.

L'étude des caractéristiques physiques et organoleptiques de l'huile essentielle met en évidence sa qualité par correspondance avec les données de la littérature. Elle se distingue par une densité, un indice de réfraction, une miscibilité à l'éthanol comparables à ceux donnés par les normes et la pharmacopée.

L'analyse chromatographique a révélé la présence de 16 composés dans la composition chimique de l'huile essentielle extraite avec des pourcentages différents, le composé majoritaire est présent à 82.96%.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de thym a été réalisée sur une gamme de microorganismes référenciés afin d'apprécier son pouvoir antimicrobien. La méthode d'aromatogrammes a montré que l'huile essentielle extraite de thymus capitatus a une action inhibitrice vis-à-vis des souches testées. Parmi les souches testées la bactérie Escherichia coli est la plus sensible à l'action de cette huile.

La méthode de la CMI confirme la sensibilité d'Escherichia Coli vis-à-vis l'HE de thym avec une CMI de 419.2 µg/ml, la valeur de la CMB qui est égale à la valeur de la CMI montre son action bactéricide sur cette souche, par contre les autres souches se sont avérées résistantes.

Conclusion générale

L'ensemble des résultats obtenus constitue une phase importante dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement actives. Afin de mettre en valeur l'exploitation des huiles essentielles dans le domaine thérapeutique, ces résultats peuvent être complétés par d'autres études plus approfondies envisagées par les perspectives proposées :

- Il est intéressant d'utiliser d'autres techniques d'analyses plus sophistiquées telle que la spectrométrie de masse et la RMN pour l'identification et la quantification de la composition chimique de l'huile essentielle de thym ;
- Il est très souhaitable d'étudier l'activité antibactérienne par des méthodes automatisées permettant ainsi un gain de temps et une exploitation plus efficace du pouvoir antimicrobien dans les industries pharmaceutiques.
- Elargir la gamme des souches testées et l'étude de nouvelles activités biologiques de l'huile essentielle de thym.
- Il est bénéfique de procéder à l'exploitation de l'hydrodistillation Clevenger à l'échelle pilote.

Références bibliographiques

- [1]. Benayache, F., Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret.
- [2]. Ilbert, H., et al., eds. Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie. Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches. Vol. 73. 2016, Montpellier : CIHEAM / FranceAgriMer. 222.
- [3]. Chemloul, F., Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* de la région de Tlemcen. 2014.
- [4]. Chikhoun, A., Huiles essentielles de thym et d'origan. 2007, INA.
- [5]. Mebarki, N., Extraction de l'huile essentielle de *thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse antimicrobienne. 2010.
- [6]. Saidj, F., Extraction des essences du *thymus numedius kabylliica*. 2007, Université M'hamed Bougara de Boumerdès.
- [7]. Alouache, F., S. Benmeziane, and M.E. Rahmani-Berboucha, Etude comparative des activités biologiques des huiles essentielles et extraits volatiles (CO₂ supercritique) de plantes aromatiques du genre *Thymus*. 2017.
- [8]. Jean, B., Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). 2009: Lavoisier.
- [9]. Jouault, M.S., La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Université de Lorraine, Nancy, 2012.
- [10]. Zhiri, A. and D. Baudoux, Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Ghislenghien: Pranarôm International, 2007.
- [11]. Bouguerra, A., Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *foeniculum vulgare* Mill. 2012.
- [12]. Chibani, S., Etude phytochimique et biologique de six plantes médicinales de l'est Algérien. 2013.
- [13]. Fekih, N., Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *pinus* poussant en algérie. 2015.
- [14]. Quézel, P. and S. Santa, 1962-1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris. 2.
- [15]. Kabouche, A., Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des *Lamiaceae*. 2005.
- [16]. L, T., Les plantes en famille. 2014. 56.
- [17]. Ložienė, K., J. Vaičiūnienė, and P.R. Venskutonis, Chemical composition of the essential oil of creeping thyme (*Thymus serpyllum* L.) growing wild in Lithuania. *Planta medica*, 1998. 64(08): p. 772-773.

- [18]. Guinoiseau, E., Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: Séparation, identification et mode d'action. 2010, Université de Corse.
- [19]. Cosentino, S., et al., In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. Letters in applied microbiology, 1999. 29(2): p. 130-135.
- [20]. El Ajjouri, M., et al., Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'oeuvre. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 2008. 12(4): p. 345-351.
- [21]. Fernandez, X., La chimie des huiles essentielles: Tradition et innovation. 2017: Vuibert.
- [22]. Goupy, J. and L. Creighton, Introduction aux plans d'expériences-3ème édition-Livre+ CD-Rom. 2006: Dunod.
- [23]. Fadil, M., et al., Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse. J. Mater. Environ. Sci., 2015. 6(8): p. 2346-2357.
- [24]. Zayyad, N., A. Farah, and J. Bahhou, Analyse chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des trois espèces de *Thymus*: *Thymus zygis*, *T. Algeriensis* et *T. bleicherianus*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 2014. 83(118): p. 132.
- [25]. Mnayer, D., Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. 2014, Université d'Avignon.
- [26]. Laib, I., Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. 2010.
- [27]. Bélilia, B.M., Optimisation des procédés d'extraction de l'huile essentielle du thym et activité antimicrobienne. 2011, Université M'hamed Bougara de Boumerdès.
- [28]. OUIS, N., Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil, et de persil., in Departement de chimie. 2015, Université d'Oran Ahmed Ben Bella.
- [29]. Francois Denis, M.-C.P., Christian Martin, vincent cattoir, Bactériologie Médicale Techniques usuelles. 3 ed. 2016.
- [30]. Khanfri, N., Optimisation des techniques d'extraction par hydrodistillation et hydrodistillation assistée par microonde de l'huile essentielle de cannelle algérienne: espece poussant en Algérie. 2012.
- [31]. Touzouirt, S., et al., Optimisation de la stabilité d'une émulsion de Pickering H/E à l'aide de la méthodologie des surfaces de réponses. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 2017. 95(1): p. 77-82.
- [32]. Karam, S., Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt. Université de Limoges, 2004.

- [33]. Lkhoumsi Driss, et al. Guide des bonnes pratiques de collecte des plantes aromatiques et médicinales du maroc. 2014 [cited 2018 12/04/2018]; Available from: www.fellah-trade.com/ressources/pdf/GBPC-Francais.pdf.
- [34]. Boughendjioua, H., Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Composition chimique, activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de citrus limon, cinnamomum zeylanicum et thymus numidicus. Doctorat en sciences spécialité: Biologie végétale. Université Badji Moktar, Annaba, 2014. 117: p. 125-130.
- [35]. Européenne, P., 6e édition (2008). Conseil de l'Europe, Strasbourg, France.
- [36]. Haddouchi, F., et al., Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de Thymus fontanesii Boiss & Reut. Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie, 2009. 5(2).
- [37]. Zeghib, A., Etude phytochimique et activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale d'extraits et d'huiles essentielles de quatre espèces endémiques du genre Thymus. 2013.

Glossaire

Glossaire

American Type Culture Collection (ATCC) : est une société privée américaine sans but lucratif, centre de ressources biologiques, dont la mission se concentre sur l'acquisition, l'authentification, la production, la conservation, le développement et la distribution de la norme de référence de micro-organismes.

Antibiogramme : est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus.

Antifongique : Molécule agit contre les infections provoquées par les champignons ou les levures parasites.

Anti-inflammatoire : est une substance agissant contre les inflammations.

Antimicrobien : détruit les micro-organismes

Antioxydant : molécules ou ensemble de molécules capables de neutraliser des radicaux libres ayant ainsi un rôle de défense au sein de la membrane ou de la cellule.

Aseptique : empêche la contamination bactérienne, virale ou provenant d'autres micro-organismes.

Céfoxitine : est un antibiotique de la famille des bêta-lactamines, classé parmi les céphalosporines, dites de 2^e génération. Le céfoxitine exerce une action bactéricide *in vitro* en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire

Clevenger : Un montage en verre, avec un ballon ou on met le matériel végétal à l'ébullition et un tube ascendant qui termine avec un réfrigérant verticalement pour condenser les gouttes qui décent dans l'essencier qui se termine par un réservoir énuméré.

Dermocausticité : une forte irritation voire une brûlure de la peau et des muqueuses.

Extraction : Technique chimique classique pour obtenir des composés organiques à partir du matériel végétal séché ou frais.

Hépatotoxicité : est considérée comme le pouvoir qu'a une substance de provoquer des dommages au foie.

Innoculum : Échantillon contenant des germes vivants, destiné à être introduit au sein d'un milieu favorable à sa multiplication, afin de l'identifier, de l'étudier ou d'en produire une quantité supérieure.

MC Farland : est l'unité de mesure de la densité pour préparer les suspensions des microorganismes, il est utilisé lors de la préparation des inoculums bactériens pour les tests de sensibilité aux agents microbiens.

Moisissure : Champignon microscopique, de couleur verdâtre ou blanchâtre, qui se développe à la faveur de l'humidité et le plus souvent de l'obscurité, à la surface des substances organiques dont il entraîne une altération.

Néphron : est l'unité structurale et fonctionnelle du rein.

Neurotoxicité : est l'action d'une substance neurotoxique sur le système nerveux. Il peut s'agir d'éléments chimiques comme les métaux lourds, de composés chimiques ou de substances biologiques comme les neurotoxines.

Papier buvard : est un papier poreux capable d'absorber par capillarité une petite quantité de liquide.

Point éclair : correspond à la température la plus basse à laquelle un corps combustible émet suffisamment de vapeurs pour former, avec l'air ambiant, un mélange gazeux qui s'enflamme sous l'effet d'une source d'énergie

Pouvoir rotatoire : également appelé activité optique est la propriété qu'ont certains milieux de faire tourner le vecteur d'un faisceau lumineux les traversant.

Rendement d'extraction : Le rendement de l'extraction est exprimé en pourcentage, et correspond au rendement moyen spécifique d'une substance.

Rifampicine : est un antibiotique de la famille des rifamycines utilisé pour traiter un certain nombre d'infections bactériennes dont la tuberculose, la lèpre et la légionellose en combinaison avec d'autres antibiotiques. La rifampicine est administrable par voie orale et par injection intraveineuse.

Souche ATCC : est une souche de référence utilisée dans le contrôle microbiologique des antimicrobiens.

.

Annexes

Annexe 01

- **Coefficient de détermination R^2 :**

Le coefficient de détermination R^2 (soit le carré de coefficient de corrélation linéaire r), est un indicateur qui permet de juger la qualité d'une régression. Il mesure l'adéquation entre le modèle et les données observées, ou encore à quel point l'équation de régression est adaptée pour décrire la distribution des points.

- **Coefficient Q^2 :**

Le coefficient Q^2 représente le pourcentage de la variation de la réponse prédite par le modèle. Il indique dans quelle mesure le modèle prédit de nouvelles données. Un modèle utile devrait avoir un grand Q^2 . Une mauvaise reproductibilité (contrôle médiocre de l'erreur expérimentale) et / ou une mauvaise validité du modèle (le modèle est incorrect) conduit à un mauvais Q^2 .

- **Validité de modèle :**

Lorsque la barre de validité du Modèle est supérieure à 0,25, il n'y a pas de manque d'ajustement du modèle (l'erreur du modèle est dans la même plage que l'erreur pure c'est-à-dire la reproductibilité).

- **Degré de liberté ddl :**

Représente le nombre de coefficient indépendants que la régression permettra d'estimer.

- **P-value :**

C'est la probabilité qu'un coefficient soit négligeable. On calcule cette p-value à partir du rapport du coefficient à son écart-type (t de student).

Quantiles d'ordre 0.95 de la loi de Fisher

Degré de liberté du numérateur sur la première ligne

Degrés de liberté du dénominateur sur la colonne de gauche

Tableau 01 : Table de F-critique

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165

Annexe 02

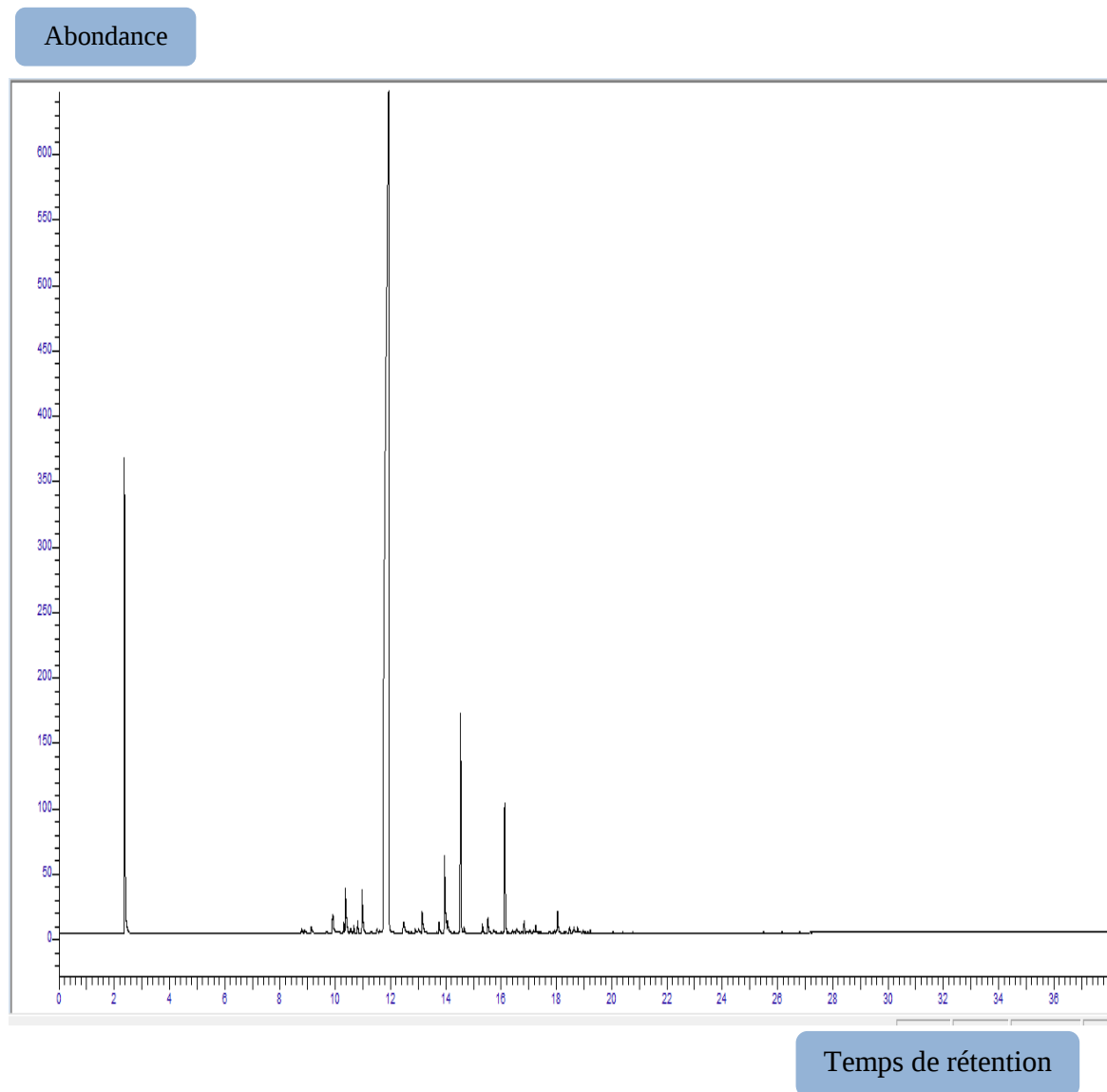


Figure 1: Chromatogramme de l'huile essentielle de *thymus capitatus*.

Software Version : 6.3.2.0646 Date : 09/05/2018 12:34:09
 Operator : manager Sample Name :
 Sample Number : Study :
 AutoSampler : NONE Rack/Vial : 0/0
 Instrument Name : clarus580 Channel : A
 Instrument Serial # : None A/D mV Range : 1000
 Delay Time : 0,00 min End Time : 38,00 min
 Sampling Rate : 12,5000 pts/s
 Sample Volume : 1,000000 ul
 Sample Amount : 1,0000 Area Reject : 0,000000
 Data Acquisition Time : 09/05/2018 11:11:52 Dilution Factor : 1,00
 Cycle : 1

Raw Data File : D:\analyses 2018\ayati\omari.raw
 Inst Method : C:\PenExe\TdWS\Ver6.3.2\Examples\ramp10deg from D:\analyses
 Proc Method : C:\PenExe\TdWS\Ver6.3.2\Examples\ramp10deg.mth from
 Calib Method : C:\PenExe\TdWS\Ver6.3.2\Examples\ramp10deg.mth from
 Report Format File : C:\PenExe\TdWS\Ver6.3.2\Examples\ramp10deg.rpt
 Sequence File : C:\PenExe\TdWS\Ver6.3.2\Examples\omari.seq

rapport analyse

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [μ V·s]	Height [μ V]	Area [%]	Norm. [%]	Area/Height [s]
23	c1	9,893	10417,27	11673,41	0,16	0,16	0,8924
24	c2	9,910	41001,95	14029,95	0,64	0,64	2,9225
27	c3	10,312	13280,32	7736,17	0,21	0,21	1,7167
28	c4	10,362	96137,19	34068,83	1,51	1,51	2,8219
29	c5	10,559	9252,57	3070,54	0,15	0,15	3,0133
30	c6	10,668	9955,55	5275,30	0,16	0,16	1,8872
31	c7	10,810	16450,49	9372,72	0,26	0,26	1,7551
33	c8	10,968	82032,42	32586,86	1,29	1,29	2,5173
38	c9	11,511	7596,82	3094,99	0,12	0,12	2,4546
41	c10	11,926	5275008,06	643695,26	82,96	82,96	8,1945
43	c11	12,470	37642,22	8296,80	0,59	0,59	4,5370
49	c12	13,138	47379,98	15930,03	0,75	0,75	2,9743
58	c13	13,953	154368,95	58590,10	2,43	2,43	2,6347
62	c14	14,537	309483,13	168550,09	4,87	4,87	1,8361
75	c15	16,128	210643,02	98801,26	3,31	3,31	2,1320
99	c16	18,045	37653,27	16541,35	0,59	0,59	2,2763
			6358303,20	1,13e+06	100,00	100,00	

Missing Component Report

Component: Expected Retention (Calibration)

All components were found

Figure 2 : Rapport d'analyse de L'HE de thymus capitatus obtenu par la CPG

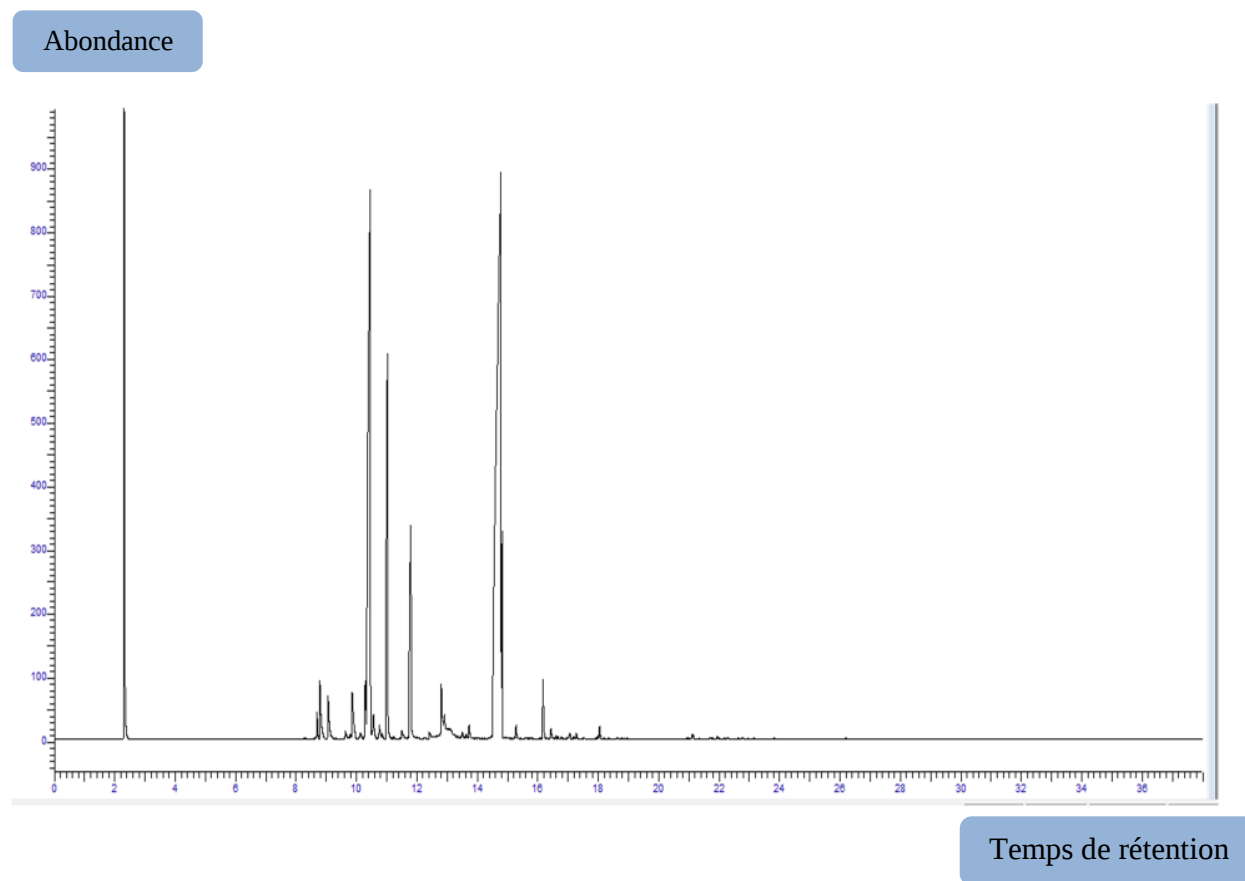


Figure 3 : Chromatogramme de l'HE de thymus zygis.

Software Version : 6.3.2.0646 Date : 05/06/2018 12:08:50
 Operator : manager Sample Name :
 Sample Number : Study :
 AutoSampler : NONE Rack/Vial : 0/0
 Instrument Name : clarus580 Channel : A
 Instrument Serial # : 580S12053104 A/D mV Range : 1000
 Delay Time : 0,00 min End Time : 38,00 min
 Sampling Rate : 12,5000 pts/s
 Sample Volume : 1,000000 ul
 Sample Amount : 1,0000 Area Reject : 0,000000
 Data Acquisition Time : 05/06/2018 11:00:38 Dilution Factor : 1,00
 Cycle : 1

Raw Data File : D:\analyses 2018\layati\laomarisehakire fait.raw
 Inst Method : D:\Analyse 2017\semsoum\programme from D:\analyses
 Proc Method : D:\Analyse 2017\semsoum\programme.mth from
 Calib Method : D:\Analyse 2017\semsoum\programme.mth from
 Report Format File : D:\Analyse 2017\semsoum\programme.rpt
 Sequence File : C:\PenExe\TdWS\Ver6.3.2\Examples\laomarisehakire fait.seq

DEFAULT REPORT

Peak #	Time [min]	Area [uV.s]	Height [uV]	Area [%]	Norm. [%]	BL	Area/Height [s]
35	8,692	78077,79	42069,83	0,43	0,43	VB	1,8559
36	8,787	288285,25	90778,85	1,58	1,58	BB	3,1757
38	9,057	220239,39	67624,71	1,21	1,21	VV	3,2568
44	9,856	255380,42	72627,43	1,40	1,40	VV	3,5180
46	10,288	207406,07	90488,22	1,14	1,14	VV	2,2921
47	10,452	4383165,57	881910,31	24,01	24,01	VV	5,0854
54	11,024	1802436,85	604596,94	9,87	9,87	VE	2,9812
62	11,796	1140746,60	335188,76	6,25	6,25	VE	3,4033
75	12,804	283950,78	84867,41	1,56	1,56	VV	3,3458
95	14,773	8760935,19	889448,74	47,98	47,98	VV	9,8498
96	14,821	540011,35	326088,00	2,96	2,96	VV	1,6560
106	15,278	43829,09	20739,97	0,24	0,24	VV	2,1133
118	16,168	210554,48	92533,15	1,15	1,15	VV	2,2754
140	18,046	42733,11	20065,73	0,23	0,23	VE	2,1297
		18257731,95	3,60e+06	100,00	100,00		

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration)

All components were found

Figure 4 : Rapport d'analyse de l'HE de thymus zygis obtenu par la CPG.

Annexe 03

1. Souches microbiennes utilisées :

- **Escherichia coli** : ou colibacille est un bacille à gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae mesurant 2 à 4 μm de long sur 0.4 à 0.6 μm de large. Elle est fine et allongée à extrémités arrondies, mobile.

Elle pousse facilement sur les milieux ordinaires en 24h à 37 °C en aérobiose et anaérobiose, et se multiplie en milieu synthétique avec source de carbone simple comme le glucose. Sur milieu gélosé les colonies sont lisses, brillantes de structure homogène.

E. coli possède une catalase mais est dépourvu d'oxydase. Elle fermente le glucose et le lactose avec une production de gaz.

- **Pseudomonas aeruginosa** : ce sont des bacilles à gram négatif fines et longs (de 1 à 3 μm de long sur 0.5 à 1 μm de large), non fermentaires, ubiquitaires et saprophytes très répandues dans l'environnement.

Anciennement appelé pyocyanique du fait de sa capacité à donner un pigment de couleur bleu-vert. Ce genre est facile à cultiver sur de nombreux milieux de culture en aérobiose à 37°C.

Les colonies larges, isolées, grandes, au centre bombé et à bord irrégulier, dégagent une odeur aromatique.

- **Staphylococcus aureus** : S. aureus est une cocci à coloration de Gram positive. Il mesure de 0,5 à 1 μm de diamètre, ne sporule pas, est immobile, aéro-anaérobie facultatif et possède une catalase et une coagulase. S. aureus, espèce type du genre Staphylocoque, parfois appelée staphylocoque doré.

- **Candida albicans** : C'est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre candida. Sa culture en boîte de Pétri donne des colonies qui sont grandes, rondes, de couleur blanche ou crème. C'est un champignon unicellulaire qui se trouve dans le tube digestif et dans la bouche de la plupart des êtres humains, il n'entraîne habituellement aucune maladie ou symptôme en particulier. Il provoque des infections fongiques la candidose essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique.

2. Milieux utilisés :

- **Milieu Chapman:** c'est le milieu sélectif des bactéries halophiles (organisme qui a besoin de forte concentration en sel dans son milieu pour vivre) et plus particulièrement fermentant le mannitol. Il est utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus*.

Une coloration rouge de milieu indique la non fermentation de mannitol. Les colonies sont mannitol -.

Une coloration jaune de milieu indique la fermentation de mannitol. Les colonies sont dites mannitol +.

- **Milieu Hektoen :** c'est un milieu de culture des colonies de bacilles gram négatif. Le milieu contient trois glucides : lactose, saccharose et salicine. Le système d'indicateurs colorés, composé de bleu de bromothymol et de fuchsine acide permet de colorer en jaune orangé les entérobactéries lactose-positif et en bleu vert les lactose-négatif.

Tableau 2 : Composition des milieux de culture.

Milieu	Composition
Gélose de Mueller-Hinton (MH)	Infusion de viande de bœuf 300 g/l, hydrolysate de caséine 17,5 g/l, amidon 1,5 g/l, agar 17 g/l, pH =7,4± 0,2
Gélose nutritive ordinaire	Extrait de viande de bœuf 1 g/l, extrait de levure 2 g/l, peptone 5 g/l, chlorure de sodium 5 g/l, agar 15 g/l, pH =7,4±0,2
Milieu hektoen	Pour 1 litre de milieu : - Peptone pepsique de viande 12,0 g - Extrait autolytique de levure 3,0 g - Lactose 12,0 g – Saccharose 12,0 g - Salicine 2,0 g - Sels biliaires 9,0 g - Chlorure de sodium 5,0 g - Thiosulfate de sodium 5,0 g - Citrate ferrique ammoniacal 1,5 g - Bleu de bromothymol 65 mg - Fuchsine acide 40 mg - Agar agar bactériologique 13,5 g
Milieu Chapman	pour 1L de milieu :Peptone 10.0g, extrait de viande de bœuf 1.0g, chlorure de sodium 75.0g, mannitol 10.0g, rouge de phénol 0.025g, agar-agar 15.0g, eau distillée qsp1L

Examen microscopique à l'état frais : dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pipette pasteur stérile on prélève une à deux colonies de la souche bactérienne à tester qu'on met dans

une goutte d'eau physiologique entre lame et lamelle et l'on observe à l'aide de microscope optique.

3. Résultats de l'examen à l'état frais :

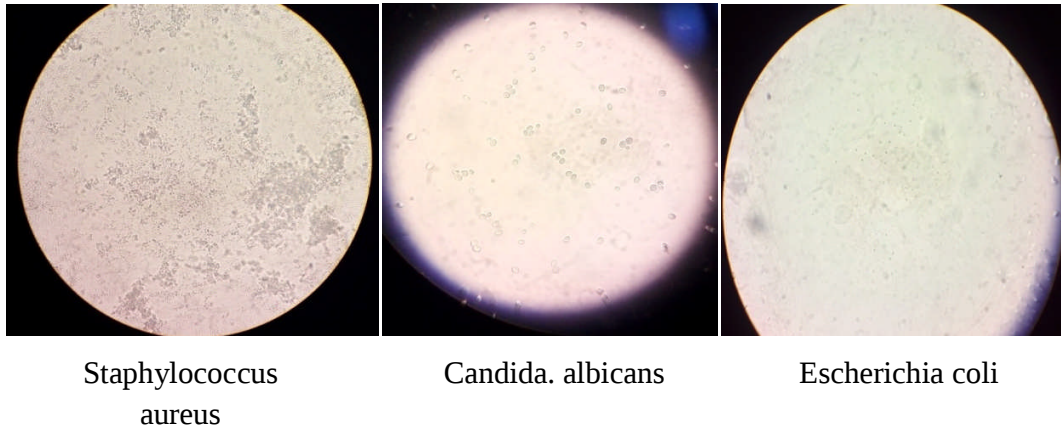


Figure 5: Résultats de l'examen à l'état frais.

4. Coloration de gram :

Cette technique a été mise au point en 1884 par Hans Christian Gram. Elle permet la distinction de deux types de paroi donnant chacune des propriétés tinctoriales différentes à la bactérie : les bactéries à gram positif sont colorées en violet et les autres dites à gram négatif sont colorées en rose. La coloration de gram a été effectuée selon la méthode suivante :

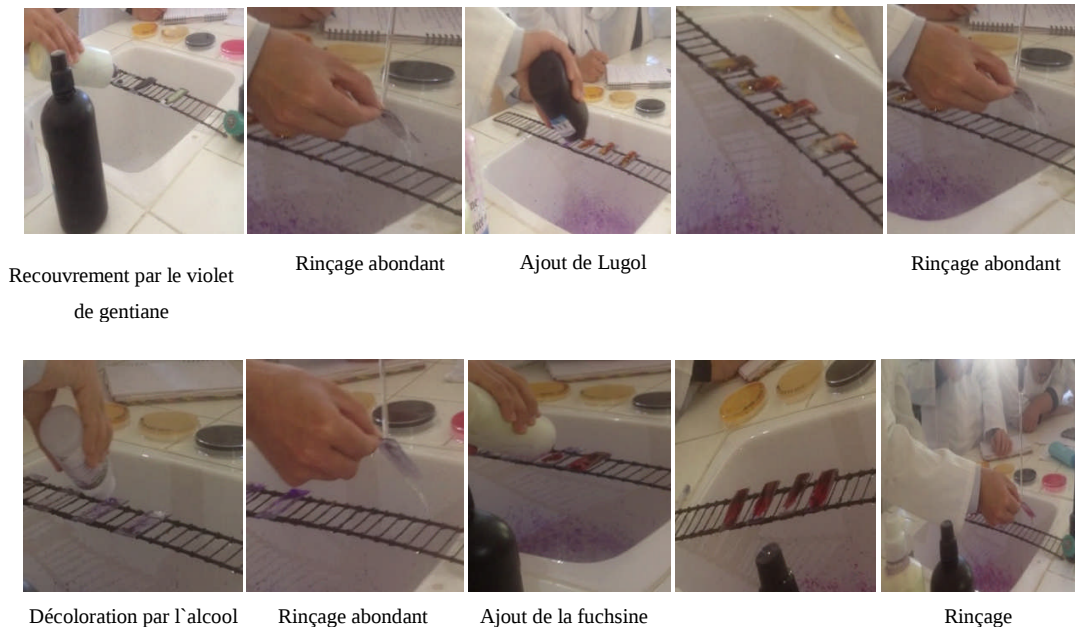


Figure 6 : Etapes de la coloration de gram.

- 1) la préparation d'un frottis de la souche à tester, en raclant une petite colonie bactérienne isolée à l'aide d'une pipette pasteur, que l'on dépose sur une lame avec une goutte d'eau physiologique stérile, ensuite l'étalement de l'échantillon en couche mince et le séchage de frottis au-dessus de la flamme de bec bunsen puis sa fixation avant coloration.
- 2) Le versement du premier colorant qui est le violet de gentiane sur le frottis d'une manière à ce qu'il soit complètement coloré, on le laisse agir pendant 1 minute puis le rinçage de frottis à l'eau de robinet.
- 3) L'ajout du lugol, qu'on laisse agir 1 minute sur le frottis puis on effectue un rinçage à l'eau de robinet.
- 4) La décoloration par l'alcool éthylique pendant 5 secondes et un rinçage abondamment à l'eau de robinet.
- 5) Le versement de deuxième colorant qui est la fuchsine et on rince à l'eau de robinet.
- 6) Le séchage de lames colorées au dessus de bec bunsen puis l'observation au microscope optique (figure7) à l'objectif 100 en ajoutant une goutte d'huile d'immersion.

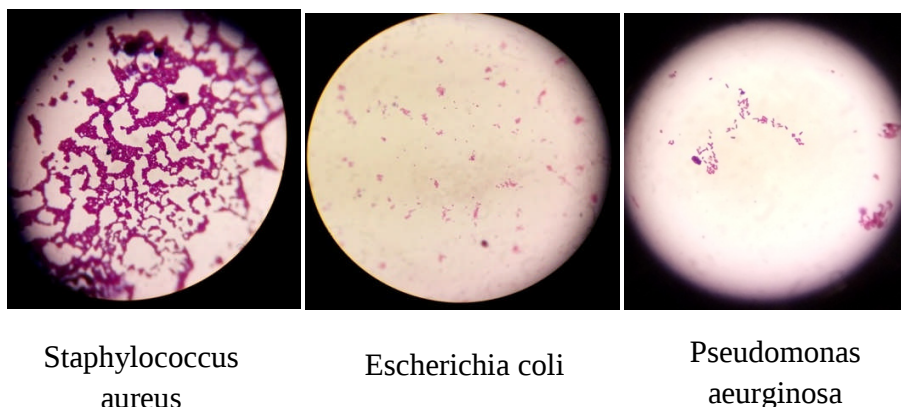


Figure 7 : Résultats de la coloration de gram.

Examen microscopique : la coloration de gram indique que les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif.

5. Test de catalase :

- **Une catalase :** est une oxydoréductase héminique qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en eau et dioxygène. $2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

La plupart des bactéries à gram négatif possèdent une catalase positive.

- **Mode opératoire :**

En travaillant dans des conditions d'asepsie, on racle une colonie de la souche à tester que l'on dépose sur une lamelle contenant de l'eau oxygénée. Le dégagement des bulles d'air implique que la souche est catalase (+) car elle dégrade le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en H_2O et O_2 .

Les résultats obtenus avec les souches testées sont représentés dans la figure 8.



Figure 8 : Résultats de test de la catalase.

6. Test de coagulase :

Nous raclons une à deux colonies de staphylococcus aureus en utilisant une pipette stérile, qu'on met dans un tube contenant du plasma, mettre l'ensemble dans l'étuve et la lecture se fait après 24 heures (figure 9).

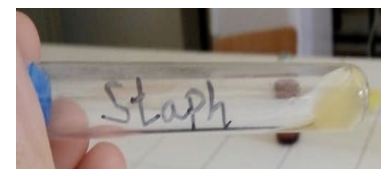


Figure 9 : Test de coagulase.

7. Test d'oxydase :

Une **oxydase** est une enzyme catalysant une réaction d'oxydo-reduction impliquant une molécule de dioxygène O_2 comme accepteur d'électrons. Dans ces réactions le O_2 est réduit en H_2O ou en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

Ce test permet de distinguer les bactéries à gram négatif, de la famille des Enterobacteriaceae à oxydase négative, des pseudomonaceae à oxydase positive.

L'enzyme oxydase ou phényle diamine oxydase intervient dans la phosphorylation oxydative.

Les bactéries qui produisent l'enzyme oxydase, oxydent le réactif en formant l'indophénol (un composé violet).

On dit qu'une bactérie est oxydase positive si un fragment de culture est capable d'oxyder la forme réduite de dérivé N-méthylés du paraphénylènediamine en semi quinone (rose violacé)

• Mode opératoire :

Ce test s'effectue en déposant une colonie prélevée sous forme d'un trait sur le disque d'oxydase. Si une coloration bleu-mauve apparaît le test est positif (figure 10).

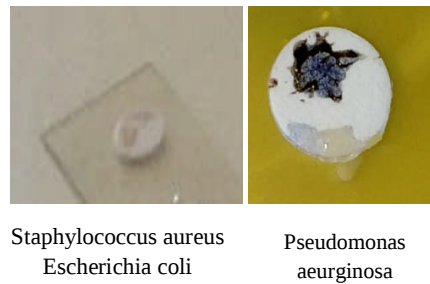


Figure 10 : Résultats de test d'oxydase.

Le test sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* a donné une coloration jaune donc ces deux bactéries sont oxydase négative (figure 10).

8. Galerie classique :

Une galerie classique est réalisée sur *Escherichia coli* et sur *pseudomonas aeruginosa* en utilisant deux milieux : le milieu TSI contenant de glucose, le saccharose et le lactose, l'autre milieu c'est le citrate de Simmons.

L'ensemencement de chaque souche à l'intérieur de chaque milieu est effectué dans une zone stérile. Les résultats sont montrés dans la figure ci-dessous :

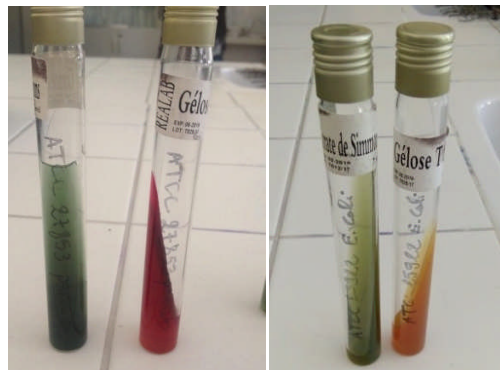


Figure 11 : Résultat de la galerie classique.

***Escherichia coli* :** pour le milieu TSI ; la partie possédant le glucose vire de rouge en jaune en présence d'*Escherichia coli* ce qui implique que ce germe attaque les glucides par voie fermentaire (en absence d'oxygène), alors il appartient à la famille des entérobacteriaceae. Par contre, le citrate de Simmons n'a pas changé de couleur de faite que cette bactérie est citrate (-).

***Pseudomonas aeruginosa* :** Comme ce germe est oxydatif, le milieu TSI n'a pas viré en jaune. Le citrate de Simmons a viré en bleu et il y'a l'apparition des colonies dessus, donc *Pseudomonas aeruginosa* est citrate (+) c'est-à-dire il utilise le citrate comme source d'énergie.

9. Galerie API :

La galerie API (figure12) est un ensemble de petites cupules prêtes à l'emploi permettant l'identification de micro-organismes, par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés. Chaque cupule contient un substrat différent sur lequel le micro-organisme considéré va réagir.

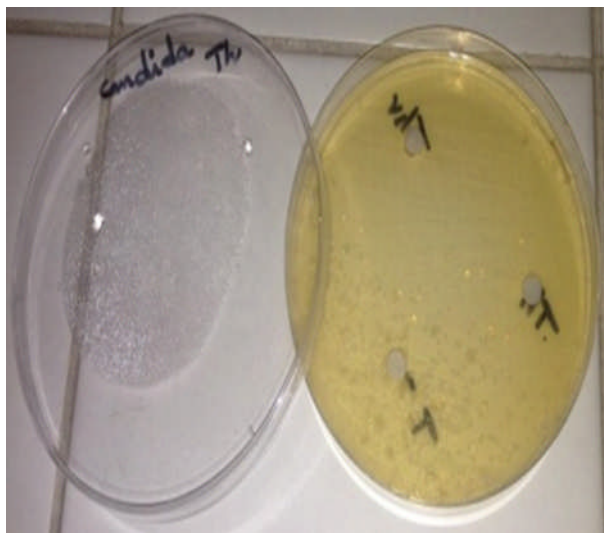
La galerie Api 20E destinée à l'identification des entérobactéries. Ce teste est réalisé seulement sur *E. coli* dans notre travail.



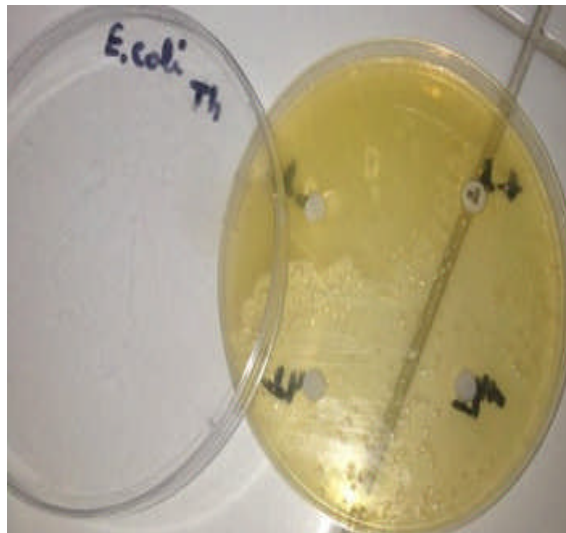
Figure 12 : Galerie API.

10. Résultats de l'aromatogramme :

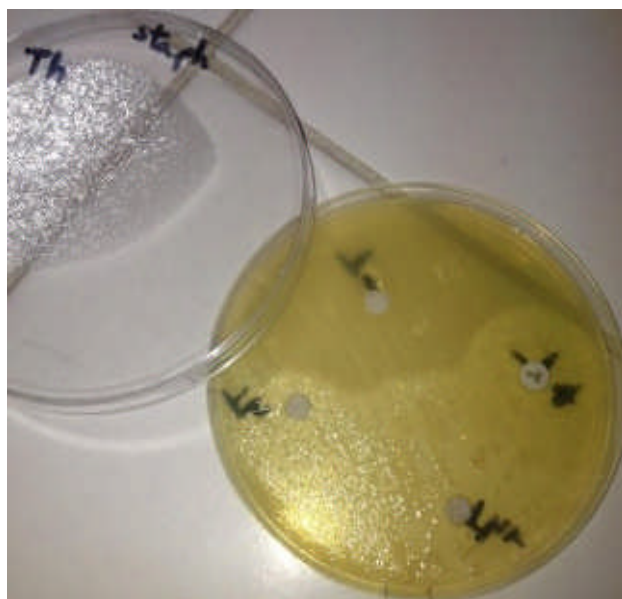
La figure ci-dessous montre les résultats obtenus par la méthode d'aromatogramme.



Candida albicans



Escherichia coli



Staphylococcus aureus



Pseudomonas aeruginosa

Figure 13 : Résultats de l'aromatogramme obtenus sur les boîtes de pétri.